

Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava



Využití kurkuminu v biomedicínských aplikacích
Use of curcumin in biomedical applications

Autor:

Jakub Zágora

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Daniela Plachá, Ph.D.

Ostrava 2018

Zadání bakalářské práce

Student: **Jakub Zágora**
Studijní program: B3942 Nanotechnologie
Studijní obor: 3942R001 Nanotechnologie
Téma: **Využití kurkuminu v biomedicínských aplikacích**
Use of curcumin in biomedical applications
Jazyk vypracování: čeština

Zásady pro vypracování:

Bakalářská práce se bude zabývat využitím kurkuminu pro přípravu materiálu na bázi biodegradovatelných biopolymerů s antimikrobiálními účinky. Teoretická část bude zaměřena na popis vlastností a možností využití kurkuminu v biomedicínských aplikacích. V praktické části budou připraveny materiály na bázi fibrinu obsahující kurkumin, které budou charakterizovány z hlediska struktury s využitím metod XRD, FTIR, SEM a dále budou provedeny mikrobiální vlastnosti a testy stability.

Seznam doporučené odborné literatury:

- L.C. Massimino, H.A.M. Fari, S.A. Yoshioka. Curcumin bioactive nanosizing: Increase of bioavailability. *Industrial Crops & Products* 109 (2017) 493–497.
- L.S. Nair, C.T. Laurencin. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 762–798.
- Ch. Mohanty, S.K. Sahoo, Curcumin and its topical formulations for wound healing applications. *Drug Discovery Today*, 22, 2017.
- D. Chester, A.C. Brown. The role of biophysical properties of provisional matrix proteins in wound repair. *Matrix Biol.* 60-61, 124-140, 2017.
- D. Akbik, M. Ghadiri, W. Chrzanowski, R. Rohanizadeh. Curcumin as a wound healing agent. *Life Sci.* 2014, 116(1):1-7.


Formální náležitosti a rozsah bakalářské práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Daniela Plachá, Ph.D.**

Konzultant bakalářské práce: Ing. Kateřina Škrlová


Datum zadání: 10.11.2017

Datum odevzdání: 21.05.2018



prof. Ing. Jaromír Pištora, CSc.
vedoucí katedry





Ing. Zdeňka Chmelíková, Ph.D.
prorektorka pro studium

Místopřísežné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a uvedl jsem všechny použité podklady a literaturu.

V Ostravě dne.....

podpis

Prohlášení o využití výsledků práce

Prohlašuji, že:

- jsem byl seznámen, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména § 35 – užití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a užití díla školního a § 60 – školní dílo.
- beru na vědomí, že Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava (dále jen „VŠB – TUO“ má právo nevýdělečně ke své vnitřní potřebě bakalářskou práci užít (§ 35 odst. 3).
- souhlasím s tím, že bakalářská práce bude v elektronické podobě uložena v Ústřední knihovně VŠB – TUO k nahlédnutí a jeden výtisk bude uložen u vedoucího bakalářské práce. Souhlasím s tím, že údaje o kvalifikační práci budou zveřejněny v informačním systému VŠB – TUO.
- bylo sjednáno, že s VŠB – TUO v případě zájmy z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona.
- bylo sjednáno, že užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem VŠB – TUO, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB – TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše).
- beru na vědomí, že odevzdáním své práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1988 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů, bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Ostravě dne:

.....
jméno a příjmení studenta

.....
adresa trvalého pobytu studenta

Práce vznikla na základě projektu: Polymerní kompozitní materiály s antimikrobiálními vlastnostmi vhodné pro biomedicínské aplikace SP2018/122.

Chtěl bych poděkovat doc. Ing. Daniele Plaché, PhD. za vedení a cenné rady při vypracování bakalářské práce. Ing. Kateřině Škrlové za konzultace, Ing. Veronice Holišové za pomoc při analýzách. Prof. RNDr. Kateřině Malachové, CSc., Mgr. Zuzaně Rybkové, PhD., a celému týmu CNT za odborné analýzy a za poskytnutí všech prostředků při vypracování bakalářské práce.

Abstrakt

Práce je zaměřena na využití kurkuminu v biomedicínských aplikacích. V teoretické části se zaměřuje na vlastnosti kurkuminu a jeho biologickou aktivitu, dále na jeho vliv při léčbě ran. Následná teoretická část se týká mechanismu léčby ran, fibrinu a biologicky degradovatelných polymerů. V praktické části je popsána příprava vzorků tří kompozitů na bázi polymerů, polylaktidu, polyvinylalkoholu a polyvinylpyrrolidonu, které byly smíseny s kurkuminem. Vzorky byly poté charakterizovány vybranými analytickými metodami. Bylo zjištěno, že polylaktid s kurkuminem podléhá nedostatečné degradaci ve vodných roztocích, a rovněž uvolňování kurkuminu je pomalé a nevyhovuje záměru využití materiálu. Oproti tomu se polyvinylalkohol s kurkuminem ve vodných roztocích rozkládá velmi rychle, a tedy je jeho použití rovněž nevhodné. Polyvinylpyrrolidon se ukázal jako nevhodný pro požadované účely, protože v pevném stavu nedosahoval potřebných vlastností.

Abstract

The work is focused on the use of curcumin in biomedical applications. In the theoretical part, it focuses on the properties of curcumin and its biological activity, as well as on its influence in the treatment of wounds. The subsequent theoretical part concerns the mechanism of wound healing, fibrin and biodegradable polymers. The practical part describes the preparation of samples of three composite on the basis of polymers, polylactide, polyvinyl alcohol and polyvinylpyrrolidone, which have been mixed with curcumin. Samples were then characterized by selected analytical methods. It has been found that polylactide with curcumin is undergone to insufficient degradation in aqueous solutions, and also release of curcumin is slow and does not meet the intention of using the material. On the other hand, polyvinyl alcohol with curcumin in aqueous solutions decomposes very quickly, so its use is also inappropriate. Polyvinylpyrrolidone has proven to be unsuitable for the desired purpose because it did not achieve the required properties in the solid state.

Klíčová slova

Kurkumin, polylaktid, polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidon, léčba ran.

Keywords

Curcumin, polylactide, polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidone, treatment of wounds.

Obsah

1. ÚVOD	12
1.1 CÍLE PRÁCE	12
2. KURKUMIN	13
2.1 FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI	14
2.1.1 <i>Struktura</i>	14
2.1.2 <i>Optické vlastnosti</i>	16
2.1.3 <i>Separace</i>	16
2.2 BIOLOGICKÉ VLASTNOSTI	16
2.3 ANTIOXIDAČNÍ VLASTNOSTI	17
2.4 PROTIZÁNĚTLIVÉ VLASTNOSTI	18
2.5 ANTIMIKROBIÁLNÍ VLASTNOSTI	20
2.6 METABOLISMUS KURKUMINU	21
2.7 LÉČBA RAN	23
3. FIBRIN	27
3.1 PŘÍPRAVA	28
4. BIOKOMPATIBILNÍ POLYMERY	29
4.1 RESORBOVATELNÉ POLYMERY	29
4.2 NERESORBOVATELNÉ POLYMERY	30
4.3 BIOLOGICKY ODBOURATELNÁ POLYMERNÍ LÁTKA (BIODEGRADABILNÍ)	30
4.4 REAKCE NA IMPLANTÁT	32
4.5 POLYLAKTID (PLA)	34
4.6 POLYVINYLALKOHOL (PVA)	36
4.6.1 <i>Příprava</i>	37
4.6.2 <i>Aplikace</i>	37
4.7 POLYVINYLPYRROLIDON (PVP)	37
4.7.1 <i>Příprava</i>	38
5. PRAKTICKÁ ČÁST	39
5.1 CHEMIKÁLIE	39
5.2 PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ	40
5.3 PŘÍPRAVA VZORKŮ	40
5.3.1 <i>Příprava kompozitu polylaktid + kurkumin</i>	41
5.3.2 <i>Příprava kompozitu polyvinylalkohol + kurkumin</i>	41
5.3.3 <i>Příprava kompozitu polyvinylpyrrolidonu</i>	42
5.4 CHARAKTERIZACE	43
5.4.1 <i>Antibakteriální testy</i>	43
5.4.2 <i>Degradace v roztocích (UV/VIS)</i>	44
6. VÝSLEDKY	45
6.1 VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	45
6.1.1 <i>Měření distribuce velikosti částic</i>	45
6.1.2 <i>Antibakteriální testy</i>	46
6.1.3 <i>UV/VIS spektrometrie</i>	47
6.1.4 <i>SEM</i>	51
6.1.5 <i>FTIR</i>	54
6.1.6 <i>Optická mikroskopie</i>	57
6.1.7 <i>XRD</i>	58
6.2 DISKUZE VÝSLEDKŮ	59

7. ZÁVĚR	60
8. LITERATURA.....	61
9. SEZNAM OBRÁZKŮ:.....	67
10. SEZNAM TABULEK:.....	69

Seznam zkratek

- CNB-001 – pyrazolový derivát kurkuminu
- ROS – reaktivní formy kyslíku
- CRSC – semikarbazonový derivát kurkuminu
- TNF- α – faktor nádorové nekrózy alfa
- IL-1 - interleukin 1
- IL-2 – interleukin 2
- IL-6 – interleukin 6
- IL-8 – interleukin 8
- IL-12 – interleukin 12
- NF- κ B – nukleární faktor kappa B
- MPO – myeloperoxidáza
- (COX)-2 - cyklooxygenáza
- iNOS – indukovatelná syntáza oxidu dusnatého
- (MAPK) p38 – proteinová kináza aktivovaná p38 mitogenem
- LPS – lipopolysacharid
- B06 – jeden z oddílů anatomicko-terapeuticko-chemické klasifikace léčiv, jiné krevní přípravky včetně fibrinolytik a hyaluronidázy
- BHMC - 2,6-bis(4-hydroxy-3-methoxybenzyliden)cyklohexanon
- MCP-1 – proteáza žírných buněk
- IL-10 – interleukin 10
- NADPH – nikotinamidadeninukleotidfosfát
- Fe-NTA – nitriltriacetát železitý
- NOS – syntáza oxidu dusnatého
- ERK $\frac{1}{2}$ – extracelulární signálově regulované kinázy

- Wnt-1 – proto-onkogenní protein
- AOM – azoxymethan
- GSK-3 β – glykogen syntetizující kináza 3 beta
- SW480 - lidská karcinomová buněčná kultura
- 5-FU – 5-fluorouracil
- HT-29 – lidské buňky rakoviny tlustého střeva
- AAPH - 2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid
- DPPH - 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
- GT29 – guanylyl transferáza
- SULT1A1 – sulfotransferáza 1A1
- SULT1A3 – sulfotransferáza 1A3
- PGE2 – prostaglandin E2
- AKT – PKB – proteinkináza B
- PI3K – fosfatidylinositol-3-kináza
- IKK - I κ B kináza
- TGF- β – transformující růstový faktor beta
- TGF – transformující růstový faktor
- PDGF – růstový faktor odvozený od trombocytů
- MMPs – matrixové metaloproteinázy
- MMP – matrixová metaloproteináza
- FGF2 – růstový faktor fibroblastů 2
- VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor
- MDA - 4,4'-diaminodifenylmethan
- DAC – diacetylkurkumin
- DGC – diglutarylkurkumin

- IC – inhibiční koncentrace
- MIC – minimální koncentrace inhibitoru
- DHC – dihydrokurkumin
- THC – tetrahydrokurkumin
- HHC – hexahydrokurkumin
- OHC – oktahydrokurkumin
- TBARS – plazmaticky reaktivní látky thiobarbiturové kyseliny
- PCL – poly(ϵ -kaprolaktam)
- GT – tragantová guma
- CUR – kurkumin
- PLA – polymléčná kyselina
- PLLA – L-forma polylaktidu
- PDLA – D-forma polylaktidu
- PDLLA – L-D-forma polylaktidu
- PET – polyethylentereftalát
- PS – polystyren
- PVA – polyvinylalkohol
- PVP – polyvinylpyrrolidon
- DCM – dichlormethan
- SEM – skenovací elektronové mikroskopie
- ATR – zeslabená úplná reflektance
- FTIR – infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací
- XRD – rentgenové difrakce

1. Úvod

Chronická onemocnění a vyvinutá resistance bakterií proti současným antibiotikům, jsou v dnešní době jednou z příčin mnohamilionových investic do medicinského výzkumu. Mnohé vědecké týmy se snaží namísto vyvíjení nových chemických sloučenin vylepšit vlastnosti již stávajících. K těmto látkám patří i kurkumin, látka rostlinného charakteru, která je známa lidstvu již po staletí. Kurkumin prokázal antibakteriální, antifungální a antioxidační vlastnosti. Jeho nízká rozpustnost ve vodě však v minulosti značně limitovala jeho použití. Jednou z možností, jak vylepšit vlastnost kurkuminu, je jeho přimíchání do matrice látky neškodné člověku, která může doručit kurkumin na požadované místo v těle, nebo může být umístěna na požadované místo a postupně kurkumin uvolňovat.

Nejperspektivnějším řešením je přidání kurkuminu do matrice, jež se přirozeně vyskytuje v lidském těle, a také i samovolně vzniká na místě určitého problému (rány). Tímto materiálem/matricí je fibrin, látka vznikající v organismu v blízkosti poranění, která urychluje léčbu. Jako čistá látka je velmi finančně náročný, z důvodů složitého získání z krevní plazmy. Rovněž příprava a manipulace s tímto materiálem vyžaduje odborné znalosti a vybavení. Z těchto důvodů je vhodné nejprve testovat vlastnosti a chování, při plnění kurkuminem, s využitím jiných, snáze dostupných, polymerů.

1.1 Cíle práce

- Rešerše využití kurkuminu v biomedicínských aplikacích
- Příprava polymerního kompozitního materiálu plněného kurkuminem
- Charakterizace připraveného materiálu a vyhodnocení výsledků

2. Kurkumin

Jedná se o žluté až oranžové přírodní barvivo, získávané z oddenků rostlin řádu zázvorníkotvarých (*Zingiberales*), čeledi zázvorovité (*Zingiberaceae*), rodu kurkuma (*Curcuma*). Kurkumin se získává převážně pouze z kurkumy dlouhé (*Curcuma longa*) [1].



Obrázek 1. A) *kurkuma longa*, rostlina a květ, B) oddenek, C) čistá kurkuma, získána vysušením a rozdrčením oddenku [2].

Kurkumin se užívá po staletí v indické a čínské kuchyni (složka kari koření), stejně jako v medicíně, kde slouží k léčbě nemocí, jako jsou revmatismus, kožní a krevní choroby, astma a bolesti těla [3, 4]. Kurkumin je široce zkoumán v mnoha studiích, které potvrzují jeho netoxicitu pro zdravé lidské buňky, zároveň byla zjištěna jeho selektivní toxicita pro nádorové buňky [5–7]. Dle studií lze předpokládat, že dávky v rozmezí 0,2 až 8 g kurkuminu jsou pro lidský organismus bezpečné [5, 8, 9]. V klinických studiích vykazoval kurkumin podstatnou protinádorovou účinnost proti nádorům pankreatu, kdy byl kombinován s protinádorovým léčivem zvaným gemcitabin [10]. Účinnost kurkuminu

je dále zkoumána především pro léčbu rakoviny krve, vaječníků, prsu, tlustého střeva, prostaty a kůže [5–7, 9].

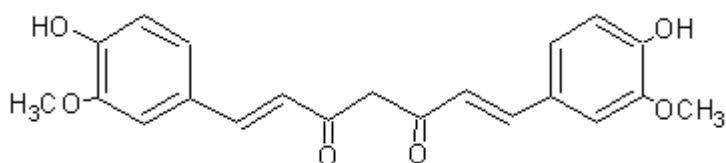
Objev kurkuminu lze datovat před zhruba dvě století, kdy byl popsán jako žluté barvivo, pocházející z oddenků kurkumy dlouhé. Barvivo bylo popsáno H. A. Voglem a J. Pelletierem (Harvard College, 1815). Následně byl čistý kurkumin poprvé izolován v roce 1842, kdy jej izoloval syn H. A. Vogela [1]. Terapeutické použití přípravků kurkumy bylo zaznamenáno již v 18. století, avšak první článek odkazující na použití kurkuminu v lékařství byl publikován v roce 1937 vědcem Oppenheimerem, který zkoumal vliv “curcunatu“, (směs sodného kurkuminu a kalciumcholátu) na léčbu zánětu žlučníku [11]. Od této doby se kurkumin začal zkoumat v mnoha studiích.

V oddencích se kurkumin nevyskytuje samostatně, obecně se izoluje jako směs kurkuminoidů. Směs se skládá z 75-80% kurkuminu, 15-20% demetoxykurkuminu a 3-5% bisdemetoxykurkuminu [1, 3].

2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

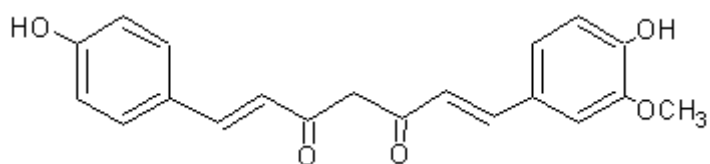
2.1.1 Struktura

Chemická struktura kurkuminu byla uveřejněna roku 1910. Roku 1913 byla uveřejněna zpráva o syntéze kurkuminu, avšak až v roce 1953 bylo užito chromatografie k separaci a kvantifikaci složek kurkuminu [1, 12]. Obrázky 2- 4 znázorňují chemické vzorce všech tří kurkuminoidů.

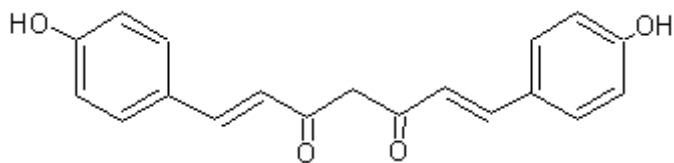


Obrázek 2. Kurkumin, 1,7-bis(4-hydroxy-3-metoxyfenyl)hepta-1,6-dien-3,5-dion.

Chemický název kurkuminu je 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)hepta-1,6-dien-3,5-dion. Souhrně lze název zapsat $C_{21}H_{20}O_6$. Hodnota disociační konstanty pK_a je 8,54. Kurkumin je prakticky nerozpustný ve vodě při kyselém nebo neutrálním pH. Je rozpustný v methanolu, ethanolu, dimethylsulfoxidu a acetonu [1]. Molární hmotnost kurkuminu je 368,38 g/mol. Bod tání je mezi 179-183 °C [2].

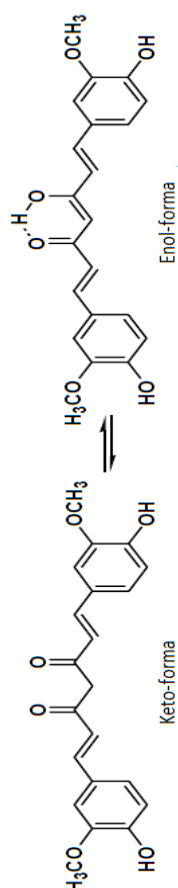


Obrázek 3. Demetoxykurkumin.



Obrázek 4. Bis-demetoxykurkumin.

Molekulární konfigurace kurkuminu může existovat ve dvou tautomerických formách, bis-keto- a enolové formě. Enolová forma kurkuminu má tři ionizované protony, které odpovídají enolové skupině a dvěma fenolickým skupinám [1, 12]. Tento tautomerický přechod je znázorněn na obrázek 5.



Obrázek 5. Keto- a enolforma [2].

V kyselých i neutrálních podmínkách a v pevné fázi převládá bis-keto forma. Naproti tomu v alkalickém prostředí převládá enolová forma, oranžový kurkumin se změní v temně rudý [1, 2]. Kurkumin je nestabilní v systémech obsahujících fosfátové pufrů o pH 7,2. V tomto systému dochází k degradaci 90% kurkuminu, kdy tento rozklad trvá přibližně okolo 30 minut [1]. Kurkumin degraduje na *trans*-6-(4'-hydroxy-3'-methoxyfenyl)-2,4-dioxo-5-hexanal, vanilin, feruloylmethan a kyselinu ferulovou [2].

2.1.2 Optické vlastnosti

Barva kurkuminu je žlutá, až do oranžova. V roztoku methanolu absorbuje při maximální vlnové délce 430 nm [1, 13, 14]. Studie excitovaných stavů kurkuminu ukázaly, že doba excitace kurkuminu je v nanosekundách a dochází k přenosu vodíkových atomů. Rychlý přenos vodíkových atomů a asociační konformační změny mohou hrát roli v biologických vlastnostech kurkuminu [1]. Několik studií prokázalo citlivost kurkuminu na světlo [1], kdy dochází k rozkladu při vystavení intenzivnímu záření.

2.1.3 Separace

Kurkumin lze extrahovat z oddenků pomocí organických rozpouštědel, jelikož je ve vodě nerozpustný. Nejčastěji se k extrakci využívá dichlormethan v lázni o teplotě okolo 50°C. Průmyslově se kurkumin získává sušením oddenků rostlin a drcením za zisku kurkumy. Kurkuma je směs těkavých a netěkavých olejů, bílkovin, tuků, minerálů, sacharidů, zbytkové vody a kurkuminoidů. Součástí kurkuminoidů je kurkumin, jak je uvedeno výše [1].

2.2 Biologické vlastnosti

Biologické vlastnosti kurkuminu jsou zkoumány od poloviny 20. století. Roku 1949 zveřejnili Schraufstatter a kol. v časopise Nature zprávu týkající se kurkuminu, jeho biologické aktivity a antibakteriálních vlastností. V 70. letech objevily tři nezávislé vědecké skupiny (Patil a Srinivasan – 1971, Srinivasan – 1972, Srimal and Dhawan – 1973) další rozdílné vlastnosti kurkuminu. Vlastnosti zahrnovaly schopnost snižovat množství cholesterolu v krvi, antidiabetické vlastnosti (schopnost léčit diabetes v raných stádiích), protizánětlivé vlastnosti a antioxidační vlastnosti [1, 12].

Protirakovinné vlastnosti kurkuminu jsou zkoumány od osmdesátých let minulého století. Do současnosti byly uveřejněny studie, které dokazují spojitost mezi prozánětlivými faktory v krvi a rozvinutím maligních útvarů v těle. Jelikož kurkumin snižuje množství zánětlivých faktorů, podílí se i na prevenci vzniku maligních útvarů [1, 2]. Při klinických studiích nebyly prokázány žádné škodlivé účinky kurkuminu na lidský ani zvířecí organismus [1, 2].

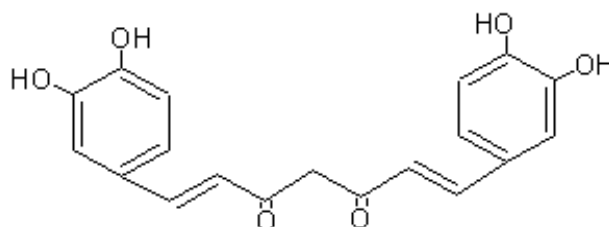
Pro výzkum jednotlivých vlastností kurkuminu bylo využito analogů kurkuminu (látek podobných kurkuminu), pro následnou možnost srovnání s kurkuminem a stanovení vlivu chemických skupin na jednotlivé vlastnosti [1].

2.3 Antioxidační vlastnosti

Antioxidační vlastnost kurkuminu je obecně spojována s následnou protizánětlivou vlastností kurkuminu. Antioxidační vlastnost byla zkoumána ve studii [15], která se zaměřila na peroxidy lipidů, jelikož byla zjištěna paralela mezi edémovými uskupeními a zvýšenou produkcí peroxidů lipidů. Methylace však snižuje antioxidační charakter látek. Jak je možné vidět z tabulky 1 a 2, byl srovnán kurkumin 1,7-bis(4-hydroxy-3-metoxifynyl)hepta-1,6-dien-3,5-dion (I) a bis(3,4-dihydroxycinnamoyl)methan (II) (obrázek 6).

Tabulka 1. Vliv kurkuminu na peroxidaci lipidů *in vitro*, MDA= 4,4'-diaminodifenylmethan [15].

Přídavek [M]	MDA/3 h [μM]	Inhibice [%]
-	17,76	-
(I) $5,15 \cdot 10^{-3}$	0,88	95,0
(I) $1,03 \cdot 10^{-3}$	10,16	42,8
(I) $1,03 \cdot 10^{-4}$	15,36	13,5
(I) $1,03 \cdot 10^{-5}$	16,64	5,4
(I) $1,03 \cdot 10^{-6}$	17,28	2,7



Obrázek 6. Bis(3,4-dihydroxycinnamoyl)methan.

Tabulka 2. Vliv bis(3,4-dihydroxycinnamoyl)methanu na peroxidaci lipidů *in vitro*, MDA= 4,4'-diaminodifenylmethan [15].

Přídavek [M]	MDA/3 h [μ M]	Inhibice [%]
-	14,000	-
(II) $1,03 \cdot 10^{-3}$	0,000	100,0
(II) $1,03 \cdot 10^{-4}$	0,000	100,0
(II) $1,03 \cdot 10^{-5}$	0,000	100,0
(II) $1,03 \cdot 10^{-6}$	5,115	63,5

Ačkoli kurkumin vykazuje antioxidační aktivitu, byly navrženy různé analogy kurkuminu pro zlepšení těchto antioxidačních vlastností. Ve srovnání s kurkuminem vykazuje syntetický monogalaktózový derivát kurkuminu silnější antioxidační vlastnosti [16]. Kurkumin inhibuje agregaci amyloidu β - a τ - peptidů v mikromolárních koncentracích, zatímco galaktózový analog je schopen inhibovat tuto agregaci v koncentracích blízkých se nanomolárním koncentracím [1].

5-chlorkurkumin, připravený z přírodního kurkuminu, má schopnost zachytu volných radikálů. CNB-001, pyrazolový derivát kurkuminu, chrání neuronové buňky před toxicitou tím, že snižuje tvorbu ROS (reaktivní formy kyslíku), a snižuje apoptózu působením na mitochondrie. Semikarbazonový derivát kurkuminu (CRSC) také ukázal účinnou antioxidační a antiproliferační aktivitu, ačkoli jeho antiradikální aktivita byla nižší než aktivita kurkuminu. Pravděpodobným místem útoku pro CRSC je jak fenolická OH, tak iminová karbonylová poloha [1].

2.4 Protizánětlivé vlastnosti

Principem protizánětlivého účinku kurkuminu je inhibice uskupení peroxidických lipidů [15]. Peroxidace lipidů je oxidační proces, kdy dochází k oxidační degradaci lipidů, při kterém volné radikály odebírají elektrony lipidům v buněčných membránách, které následně ztrácejí integritu a dochází k poškození buněk [17].

Kurkumin reguluje směrem dolů některé exprese zánětlivých cytokinů. Jako například faktor tumorové nekrózy (TNF- α), interleukiny (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12), chemokinesy a nukleový faktor (NF)- κ B. Kurkumin rovněž snižuje záněty spojené s kolitidou, zahrnující podstatné snížení vzrůstu aktivity myeloperoxidázy (MPO),

zavedeného markeru pro zánětlivé buňky (zejména polymorfonukleární leukocyty) a TNF- α [2].

Kurkumin je schopen redukovat hladinu dusitanů a regulovat směrem dolů expresi cyklooxygenázy (COX)-2, indukovatelné syntázy oxidu dusnatého (iNOS) a aktivaci proteinů kinázy (MAPK) p38 mitogenu [2].

Lipofilním derivátem kurkuminu je diacetylkurkumin (DAC) a hydrofilním derivátem diglutarylkurkumin (DGC). Při zkoumání *in vivo* bylo prokázáno, že mají analgetické a protizánětlivé účinky. Na karagenu připravené buňky edému králíka byly použity pro zjištění protizánětlivých vlastností kurkuminových derivátů. Tyto vlastnosti byly prokázány u všech derivátů. Procentní inhibice edému z králíka byla vyšší u DAC než u kurkuminu. Kromě toho byly také vyhodnoceny další deriváty kurkuminu pro jejich chemopreventivní potenciál. Na základě inhibice COX-2 má vyšší účinnost 2,6-bis(3-fluor-4-hydroxybenzyliden)cyclohexanon ($IC_{50} = 5,5 \mu M$), následován kurkuminem ($IC_{50} = 15,9 \mu M$) a 1,7-bis(3-fluoro-4-hydroxyfenyl)-1,6-heptadien-3,5-dionem ($IC_{50} = 23,7 \mu M$) (IC = inhibiční koncentrace) [1].

Tricyklické deriváty 2,6-bis(4-hydroxy-3-methoxybenzyliden)cyclohexanon, 2,6-bis(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzyliden)cyclohexanon a 2,5-bis(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzyliden)cyclopentanon inhibovaly expresi COX-2, indukovaným LPS (lipopolysacharid), a iNOS genu u myších makrofágů se stejnou účinností jako kurkumin [1].

Studie uvádí, že kurkuminový analog B06 (medicínské označení pro jiné krevní přípravky včetně fibrinolytik a hyaluronidázy) vykazuje zvýšenou protizánětlivou aktivitu ve srovnání s kurkuminem prostřednictvím inhibice aktivace c-Jun N-terminální kinázy/NF- κB [1]. *In vivo* zvířata vystavená působení B06 vykazovala významné snížení zánětlivých mediátorů v séru a ledvinách a infiltraci makrofágů v srdci a ledvinách. Další analog, 2,6-bis(4-hydroxy-3-methoxybenzyliden) cyclohexanon (BHMC), inhiboval syntézu několika zánětlivých mediátorů. BHMC potlačila gen iNOS (indukovatelná syntáza oxidu dusnatého) a enzymovou expresi a silně inhibovala sekreci a genovou expresi TNF- α (faktor nádorové nekrózy alfa), MCP-1 (proteáza žírných buněk), IL-10 a IL-6 (interleukin). Uvedené kurkuminové analogy účinně inhibují zánětlivé faktory [1].

2.5 Antimikrobiální vlastnosti

Studie [18] prokázala, že skupiny nenasycených ketonů, které jsou obsaženy v řadě přírodně se vyskytujících antibiotik, mají antibakteriální aktivitu. Při tomto zkoumání bylo objeveno, že chalkony, flavanony, flavony a několik jejich derivátů, jako například butein (2,4,3',4'-tetrahydroxychalkon), což jsou látky rostlinného původu, prokázaly znatelné potlačení růstu bakterií. Také rostlinné extrakty obsahující flavanony, flavony nebo flavonoly prokázaly bakteriostatické účinky [18].

Kurkumin prokázal znatelnou antibakteriální aktivitu při MIC (minimální koncentrace inhibitoru) mezi 5 až 50 µg/ml. Působení kurkuminu proti bakteriím *in vitro* bylo prokázáno pro více než 15 druhů (*Escherichia coli*, *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae*, *Staph. aureus*, *Staph. intermedius*, *Staph. epidermidis*, aj.). Při využití také jeho protizánětlivých vlastností na deaktivaci, či zabránění aktivace, některých enzymů, vznikajících při nemocích zažívacího traktu vyvolaných bakteriální infekcí, lze kurkumin považovat za víceúčelovou baktericidní látku [19, 20]. Při klinických testech *in vivo* nebyl zjištěn významnější vliv kurkuminu, oproti obvykle využívaným antibiotikům. Bylo však zjištěno znatelné snížení zánětlivých látek v těle v době dvou měsíců po podání léku. Při studii *in vivo* na krysách bylo zjištěno velké snížení aktivace zánětlivého enzymu NF-κB [19]. Kurkumin také ukázal synergický efekt v kombinaci s některými antibiotiky, jako jsou ampicilin, oxacilin, norfloxacin a ciprofloxacin, který však může působit jako antagonist [19].

Také komplexy kovů v kombinaci s kurkuminem jsou zajímavou alternativou pro využití synergické aktivity. Respektive se jedná o navýšení vazebného účinku na bakteriální stěny. Jako příklady těchto kovů lze uvést komplexy kurkuminu a kobaltu ve formě nanočástic, nebo stříbrné nanofilmy impregnované kurkuminem. Také spojení kurkuminu s nanokompozitním filmem na bázi komplexu sodné soli karboxymethylcelulózy a stříbra vykazovalo navýšení antibakteriální aktivity [19].

Kromě antimikrobiálních vlastností bylo prokázáno, že kurkumin působí také jako antivirotikum, fungicid a antimalarikum [19, 21]. Potencionální uplatnění kurkuminu je velmi limitováno jeho nízkou orální dostupností v těle a špatnou rozpustností ve vodě, která poté ústí k nízké absorpci, rychlému metabolismu a rychlému odstranění z organismu [19].

2.6 Metabolismus kurkuminu

Doposud bylo popsáno mnoho metabolitů kurkuminu. Tyto metabolity zahrnují dihydrokurkumin (DHC), tetrahydrokurkumin (THC), hexahydrokurkumin (HHC), oktahydrokurkumin (OHC), glukuronát kurkuminu, DHC-glukuronát, THC-glukuronát a kurkuminový sulfát [1, 22]. Bylo prokázáno, že jako první se transformuje kurkumin na DHC a THC, a až poté na monoglukuronátové konjugáty. DHC metabolity byly izolovány ze shluků kultivovaných buněk, které byly izolovány z pupenů na oddencích kurkumy. THC je jeden z hlavních metabolitů kurkuminu a bylo prokázáno, že se jedná o velmi stabilní látku. Prokazatelně bylo zjištěno, že je stabilnější než samotný kurkumin [1, 23].

Četné studie prokázaly, že THC má antioxidační, protizánětlivé, a protirakovinné účinky. THC dokázal zabránit peroxidaci lipidů vyvolanou radiací u mikrozomů v játrech krys. Rovněž indukoval antioxidační enzymy, jako je glutathionperoxidáza, glutathion-S-transferáza, NADPH (nikotinamidadenindinukleotidfosfát, koenzym, sloužící v biosyntetických drahách), chinonreduktáza, a zachytával volné radikály indukované Fe-NTA (nitriltriacetát železitý). THC byl schopen ochránit před erytromycinestolátem vyvolaným hepatocelulárním poškozením tím, že zamezoval zvýšení koncentrace sérových enzymů, jako je aspartáttransamináza, alanintransamináza, alkalická fosfatáza, bilirubin, cholesterol, triglyceridy, fosfolipidy, volné mastné kyseliny, plazmaticky reaktivní látky thiobarbiturové kyseliny (TBARS) a hydroperoxy [1, 22, 23].

Na zvířatech byly zaznamenány chemopreventivní vlastnosti tetrahydrokurkuminu (THC). U krys podávání THC v malých dávkách redukovalo aberantní krypty a polypy, vyvolané azoxymethanově (AOM) indukovaným karcinomem střev [1]. Na molekulární úrovni vykazuje THC protizánětlivou aktivitu snížením hladiny indukovatelných NOS (syntéza oxidu dusnatého) a COX-2 (cyklooxygenáza) pomocí regulace ERK 1/2 (extracelulární signálově regulované kinázy) aktivátorů. Navíc THC významně snížila expresi Wnt-1 (proto-onkogenní protein) indukovaného AOM (azoxymethan) a proteinu β -kateninu, stejně jako fosforylaci GSK-3 β (glykogen syntetizující kináza 3 beta) v tlustém střevě [1, 22].

Dalším metabolitem kurkuminu pomocí biotransformace hepatocytů je hexahydrokurkumin (HHC), který má menší schopnost inhibovat expresi COX-2 než samotný kurkumin. Molekulární modelování a ukotvovací studie prokázaly, že vazebná energie HHC na prozánětlivý enzym fosfolipázu A2 je lepší než u kurkuminu. Rovněž byla

zkoumána cytotoxicita HHC a jeho účinek na buněčný cyklus u buněk SW480 (lidského kolorektálního karcinomu). HHC zapříčinilo masivní akumulaci buněk SW480 ve fázi cyklu G1/G0. Kromě těchto nálezů bylo prokázáno, že HHC společně s 5-FU (5-fluorouracil) vykazuje synergický účinek při inhibici růstu kolorektálních rakovinových buněk HT-29 (lidské buňky rakoviny tlustého střeva), potlačením exprese COX-2. Rovněž vykazuje antioxidační aktivitu myších makrofágů [1, 22, 23].

Oktahydrokurkumin (OHC) také vykazuje protizánětlivé a antioxidační vlastnosti. Bylo prokázáno, že OHC má mnohem méně potlačující efekt k NF- κ B než kurkumin samotný, studie rovněž prokázala antioxidační aktivitu potlačením linolové oxidace indukované AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid) a sběrnou aktivitou DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl). Sběrná/záchytová aktivita OHC je vyšší než u kurkuminu [1].

Výše bylo uvedeno, že nejprve je kurkumin biotransformován na DHC a THC a tyto sloučeniny jsou následně, v případě zvířat, konvertovány na konjugáty monoglukuronidu. U rakovinových buněk GT29 se kurkumin metabolizoval na glukuronidy kurkuminu. V lidských rakovinových buňkách pouze mateřské kurkuminové molekuly vykazovaly mitotické zničení. Redukční metabolismus a chemická degradace způsobily, že kurkumin není aktivní [1, 22].

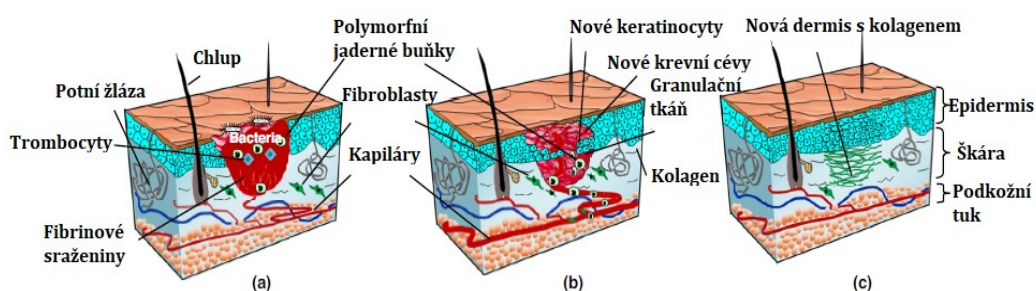
Oproti výše zmíněným metabolitům, žádný z glukuronátů (mono- ani di-) kurkuminu neprokázal biologickou aktivitu, která byla zaznamenána u kurkuminu [1]. Dojde-li k metabolické přeměně kurkuminu na glukuronáty, dochází k zamezení antibakteriálních, antioxidačních a jiných vlastností.

Posledním uvedeným metabolitem kurkuminu je sulfát kurkuminu. Tento metabolický produkt vzniká sulfatací lidským fenolsulfotransferázovým izoenzymem SULT1A1 a SULT1A3 [3]. Experimentálně bylo zjištěno, že sulfát vykazuje nižší biologickou aktivitu než samotný kurkumin. Zvláště schopnost inhibovat aktivitu PGE2 (Prostaglandin E2) ve srovnání s kurkuminem byla velmi nízká. Samotný kurkumin vykazuje lepší vlastnosti než jeho metabolity [1].

2.7 Léčba ran

Kůže je přirozenou bariérou živočichů vůči životnímu prostředí a zajišťuje řadu ochranných funkcí. Je-li celistvost kůže narušena, dochází v těle k vícestupňovým a dynamickým procesům v místě zranění, které vedou k částečnému hojení tkáně a obnovení bariérové funkce pokožky [4]. Přirozený proces hojení ran se skládá ze čtyř překrývajících se přesně definovaných fází (obrázek 7): homeostáze, zánětlivá fáze, proliferační fáze, epitelizační fáze.

- Při poranění dochází k homeostázi, jež představuje agregaci trombocytů (krevních destiček), a tím tvorbu krevní sraženiny. Krevní sraženina poskytuje extracelulární matici pro migraci buněk.
- Při následující zánětlivé fázi dochází k migraci krevních buněk, jako fagocytů, neutrofilů a makrofágů, na místo poranění. Fagocyty odstraňují cizí částice a uvolňují cytokiny pro podporu migrace a proliferace fibroblastů.
- Proliferační fáze zahrnuje tvorbu nového epitelu a cév (angiogeneze/neovaskularizace), syntézu a ukládání fragmentů extracelulárních matricových proteinů, např. kolagenová vlákna nebo granulační tkáň. Fibroblasty produkují novou extracelulární matici, z kolagenu, nezbytnou pro podporu buněčného růstu. Z toho vyplývá, že fibroblasty hrají rozhodující roli v procesu hojení ran.
- Poslední fáze, epitelizační, zahrnuje remodelaci kolagenu a tvorbu jizvy [4].

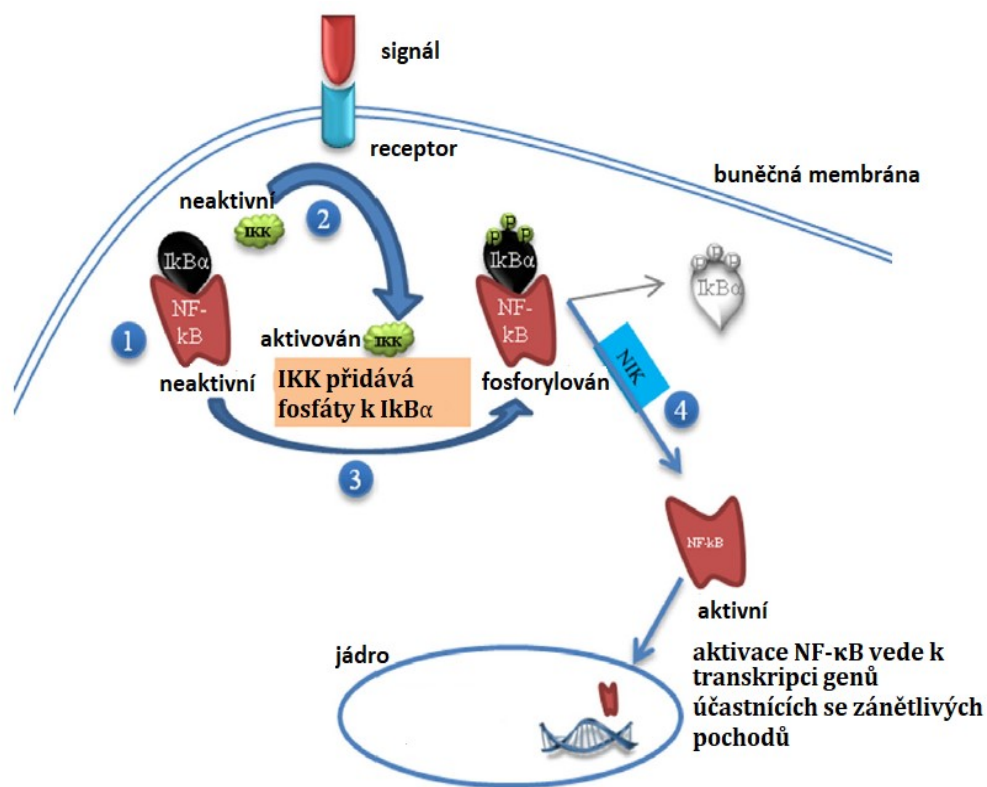


Obrázek 7. Schéma léčby rány, a) homeostáza a zánětlivá fáze, b) proliferační fáze, c) epitelizační fáze [24].

Optimální prostředek na léčbu ran by měl chránit tkáně před bakteriální infekcí, snížit záněty a indukovat proliferaci buněk, aby napomohly rekonstrukci poškozené tkáně. Vhodné je rovněž, aby působil také antioxidačně, jelikož volné radikály je možné považovat za hlavní příčinu zánětu během procesu hojení ran.

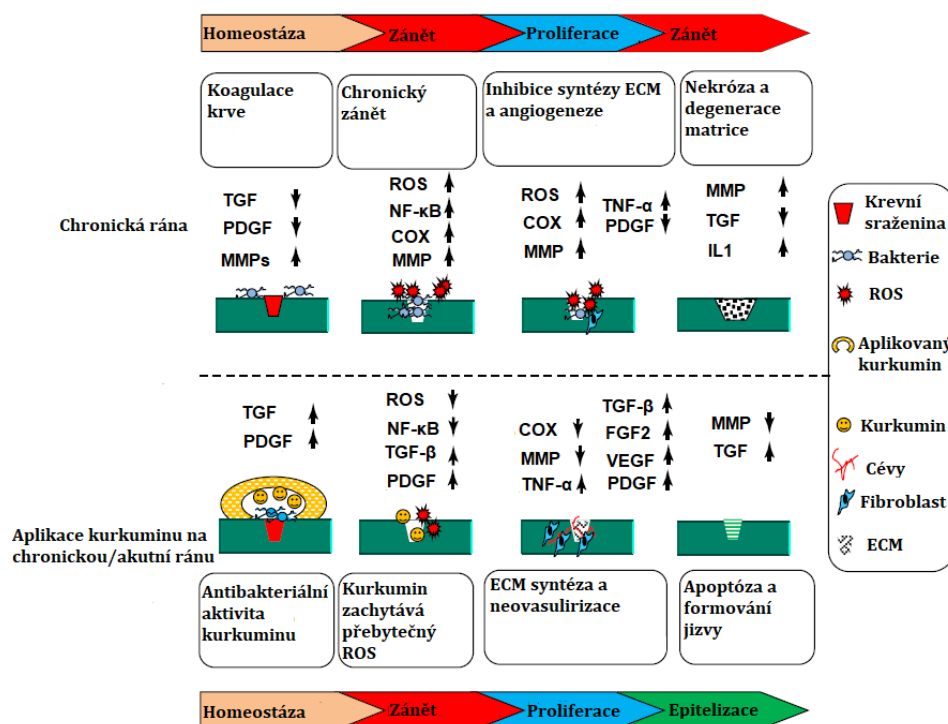
Biochemické účinky kurkuminu, jako protizánětlivé, antiinfekční a antioxidační vlastnosti, připisují této látce potenciál pro léčbu ran. Rovněž bylo zjištěno, že kurkumin zvyšuje hojení ran tím, že se podílí na remodelaci tkáně, tvorbě granulační tkáně a ukládání kolagenu [4]. Na základě výše zmíněných vlastností dokáže kurkumin podporovat léčbu a zacelování ran, jak povrchových, tak i vnitřních, v omezené míře.

Jednou z nejpozoruhodnějších vlastností kurkuminu je inhibice produkce nádorového nekrotického faktoru alfa (TNF- α) a interleukinu-1 (IL-1). Tyto dva hlavní cytokiny, uvolnění z monocytů a makrofágů, hrají důležitou roli při regulaci zánětlivých reakcí. Rovněž je stejně důležitá schopnost inhibovat aktivitu NF-(κ)B (nukleární faktor kappa B), transkripčního faktoru, který reguluje mnoho genů, které se účastní iniciace zánětlivých odezev. Nukleární faktor je normálně aktivován funkcí různých kináz (AKT, PI3K, IKK) a kurkumin působí na různé druhy kináz způsoby, které jsou znázorněny na obrázku 8.



Obrázek 8. Schéma aktivace NF-(κ) B faktoru, čísla 1-3 zobrazují možnost inhibice kurkuminem [4].

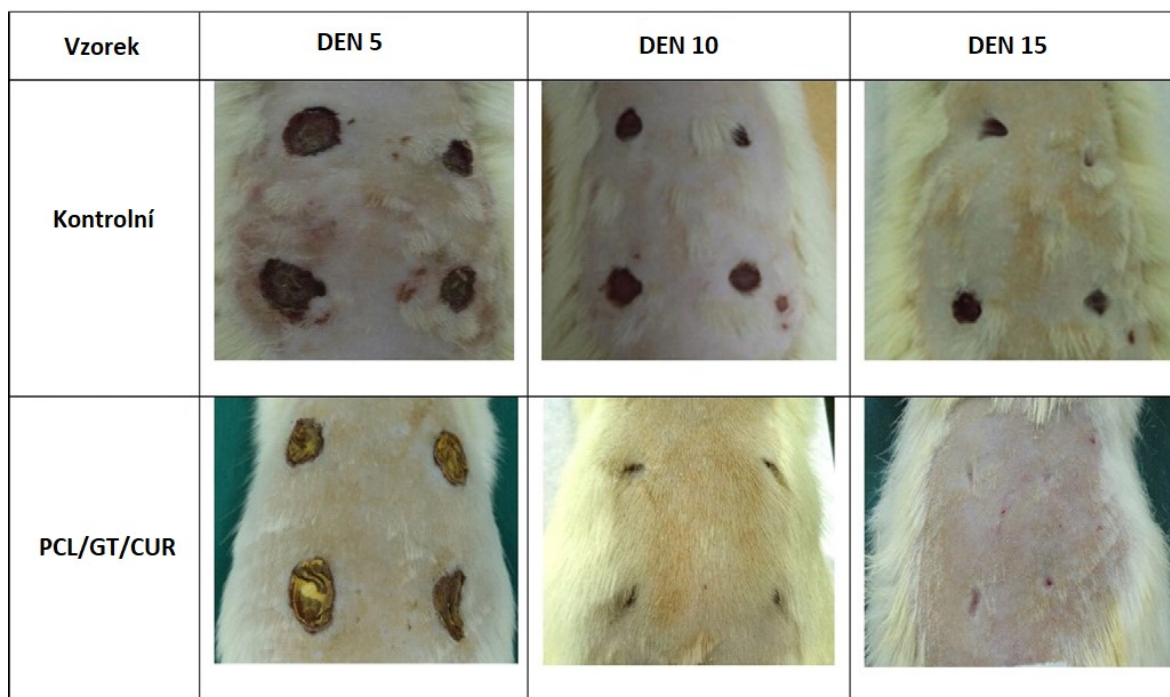
Kurkumin ovlivňuje hlavní aspekty hojení ran napomáháním tvorby nového epitelu, cév (neovaskularizace), syntézou kolagenu, a tvorbou granulační tkáně (tkáně zacelující rány) [25]. Schematicky je na obrázku 9 znázorněno, jak kurkumin ovlivňuje hojení ran.



Obrázek 9. Schématické srovnání chronické rány s ránou léčenou kurkuminem [24].

TGF – transformující růstový faktor, PDGF – růstový faktor odvozený od trombocytů, MMPs – matrixové metaloproteinázy, ROS – reaktivní formy kyslíku, NF- κ B – nukleární faktor kappa B, COX – cyklooxygenáza, MMP – matrixová metaloproteináza, TNF- α – faktor nádorové nekrózy alfa, IL-1 – interleukin 1, TGF- β – transformující růstový faktor beta, FGF2 – růstový faktor fibroblastů 2, VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor.

Studie [26], provedená na krysách, prokázala zmenšení oblasti poškození a zrychlené hojení, jako i pokles hladiny glukózy a kolagenu v krvi při použití kompozitu poly(ϵ -kaprolaktam)/tragantová guma/kurkumin (PCL/GT/CUR) ve formě nanovláken. Na obrázku 10 lze pozorovat srovnání kontrolní krysy a krysy léčené pomocí PCL/GT/CUR.



Obrázek 10. Srovnání kontrolní krysy a krysy léčení PCL/GT/CUR v průběhu 15 dní [26].

V tabulce 3 lze vidět sumární zhodnocení vlivu kurkuminu na léčbu ran a jeho ovlivňování jednotlivých látek.

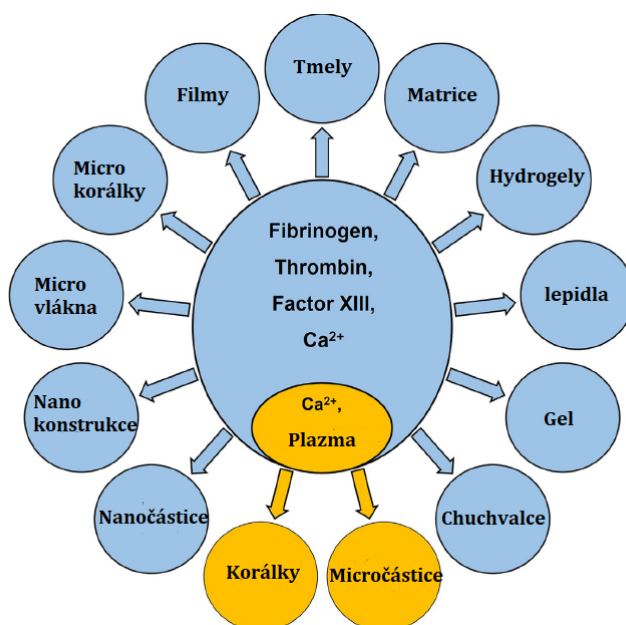
Tabulka 3. Sumární zhodnocení efektu kurkuminu na léčbu ran [4]

Fáze léčby rány	Efekt kurkuminu na léčbu
Zánětlivá	Inhibice aktivity transkripčního faktoru NF-(κ) B, snížení tvorby cytokinů TNF- α a IL-1 vedoucí ke snížení zánětu
	Čistící účinek proti reaktivním formám kyslíku (ROS), při nižší dávce kurkuminu
	Zvýšení tvorby ROS u vyšší dávky kurkuminu
	Zvýšení nebo snížení tvorby antioxidantních enzymů, závisí na dávce
Proliferační	Zlepšení migrace fibroblastů, tvorba granulační tkáně, ukládání kolagenu, tvorba nového epitelu
	Apoptotické chování v rané fázi, způsobuje odstranění nežádoucích zánětlivých buněk z místa poranění
Epitelizační	Zlepšení kontrakce rány zvýšením produkce TGF- β (transformační růstový faktor β), a tím i zvýšení proliferace fibroblastů

3. Fibrin

Fibrin je biopolymer podobný kolagenu, který se podílí na přírodním procesu srážení krve. Fibrin je odvozen od fibrinogenu, což je protein složený ze tří částí. Fibrin je jeden z nejčastějších biopolymerů používaných jako biomateriály. To je způsobeno vynikající biokompatibilitou, biologickou rozložitelností, injektovatelností a přítomností několika extracelulárních matricových proteinů (např. fibronektin), které příznivě ovlivňují adhezi a proliferaci buněk. Jedním z prvních produktů vyvinutých z fibrinu je fibrinový tmel [27].

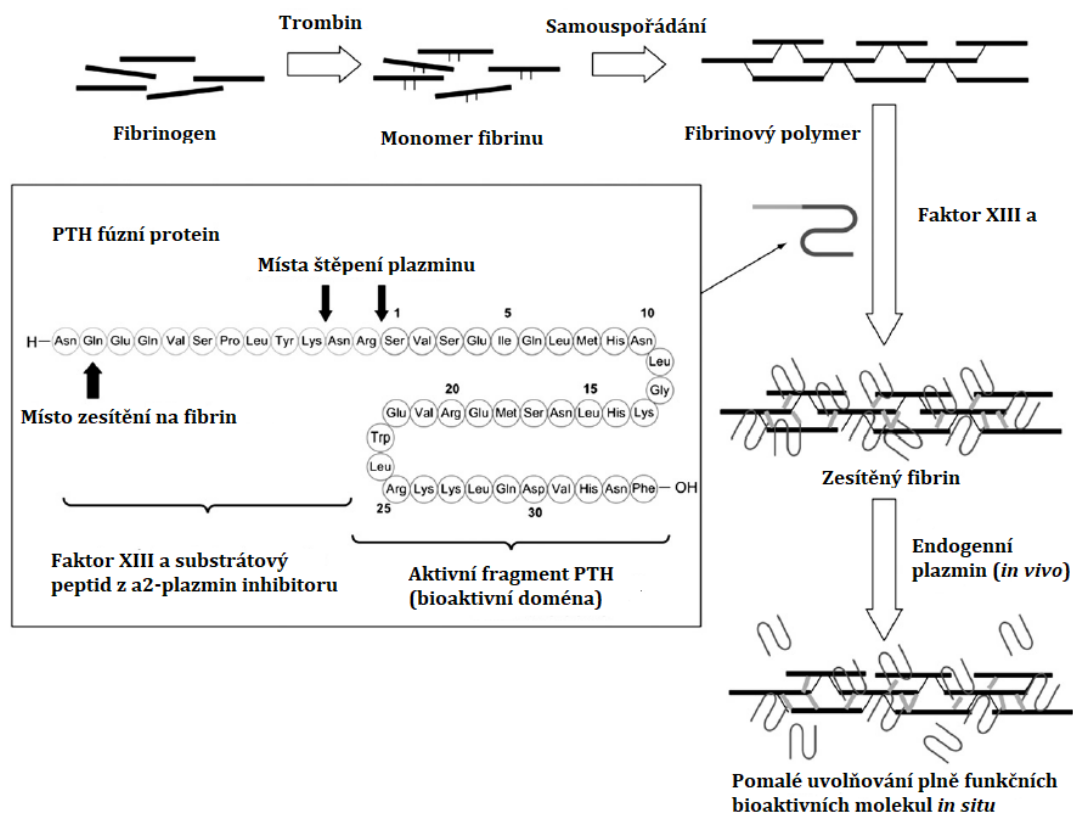
Různé produkty fibrinového utěšňování jsou klinicky používány po celém světě pro homeostázu a tkáňové utěšňování při různých chirurgických zákrocích. Díky své vstříkovatelnosti a biologické rozložitelnosti byl také zkoumán fibrin jako nosič pro bioaktivní molekuly. Bylo zjištěno, že proteiny interagují odlišně s fibrinovými sraženinami, přičemž některé růstové faktory demonstrují silnou interakci s fibrinovými maticemi. V současné době se také zkoumá několik technik zesítení pro řízení profilu uvolňování bioaktivních molekul z fibrinové matrice. Fibrinové matrice byly také zjištěny jako vynikající buněčné nosiče. Bioseeds je produkt na bázi fibrinu získaný smícháním keratinocytů s fibrinem a používá se k léčbě chronických ran. Jedinečnou vlastností buněčných nosičů na bázi fibrinu je, že vlastnosti matrice mohou být optimalizovány pro každý typ buněk [27]. Další možné uspořádání fibrinu je zobrazeno na obrázku 11.



Obrázek 11. Různá uspořádání fibrinu pro terapeutické účely [28].

3.1 Příprava

Fibrinová matrice vzniká *in vitro* pomocí fibrinogenu, trombinu a transglutaminázy (faktor XIII a), viz obrázek 12. Látky sloužící k přípravě fibrinu se získávají z krevní plazmy, pomocí ethanolového čištění. Smíchání těchto komponent v různém poměru a za různých podmínek vede ke vzniku nejrůznějších struktur, od vrstev a lepidel až ke gelům či hydrogelům [28]. Různé parametry, jako je velikost pórů či šířka vláken, lze ovlivnit i během síťování, šířka vlákna se v průměru pohybuje od 10-220 nm [28].



Obrázek 12. Schéma vzniku fibrinu [29]

4. Biokompatibilní polymery

Některé polymery jsou vhodným materiálem pro uplatnění v medicínských aplikacích, jelikož mají dobré mechanické, chemické a fyzikální vlastnosti, které lze navíc upravit jejich modifikací. Zároveň jsou tyto polymerní materiály snášenlivé lidským organismem a lze je tedy zařadit do kategorie biokompatibilních látek.

Biokompatibilní látka je taková látka, která při styku s živou tkání v organismu, nevyvolává zánětlivé reakce, nepoškozuje tkáň a není pro organismus toxická. Sloučenina by měla být také schopná podporovat interakci buněk a jiných biomateriálů v tkáni, kde byla implantována [18, 21]. Implantát je považován za biokompatibilní, když jeho přítomnost nevede ke vzniku seskupení ohnisek zánětu, které převáží podpůrné účinky tohoto implantátu [30].

Jestliže se má nějaká látka vyskytovat v blízkosti lidských tkání, nebo dokonce uvnitř těchto tkání během delší doby, je nezbytně nutné, aby byla bezpečná. Biologicky vyráběné polymerní materiály jsou ve většině případů také biokompatibilní s lidským organismem, a lze je tedy využít pro medicínské a ekologické aplikace. Vlastnosti biopolymerů jsou srovnatelné s vlastnostmi syntetických plastů. Výsledný materiál může dobře odolávat korozi, je pevný, tvrdý, stálý nebo odbouratelný apod. Tyto materiály lze rozdělit na resorbovatelné, neresorbovatelné a biologicky odbouratelné polymery.

4.1 Resorbovatelné polymery

Resorbovatelné polymery spadají do skupiny biokompatibilních materiálů. Tyto polymery si udržují požadované mechanické vlastnosti po určitou dobu, kdy plní svou funkci. V konečné fázi jsou tyto látky eliminovány metabolicky pomocí organismu, látka je rozložena až na základní nízkomolekulární látky (nejčastěji CO_2) a následně je zcela vyloučena z organismu [31, 32].

4.2 Neresorbovatelné polymery

Neresorbovatelné polymery jsou takové materiály, které jsou pro organismus biokompatibilní, ale nedochází k jejich rozpadu. Takové materiály jsou stálé a měly by plnit svou funkci do doby, dokud nebudou vyjmuty z organismu [31].

4.3 Biologicky odbouratelná polymerní látka (biodegradabilní)

V posledních dvou desetiletích 20. století dochází k částečnému přechodu od stabilních biomateriálů k biologicky odbouratelným (hydrolyticky a enzymaticky) biomateriálům, které jsou vhodné pro biomedicínské aplikace. Současné výzkumné studie předpokládají, že v budoucnu budou mnohé protetické prostředky, používané pro dočasné náhrady, nahrazeny biologicky odbouratelnými materiály. Hlavním důvodem pro vývoj biodegradabilních materiálů je především jejich biokompatibilita, a to, že není nutné implantát po terapii vyjmout z těla pacienta.

Biologicky odbouratelná polymerní látka je taková látka, která působením svého okolí degraduje. Tyto materiály jsou odbourávány, ale mohou zanechat v organismu degradační zbytky, které nemusí být z organismu zcela vyloučeny [32]. Biodegradabilní polymerní materiály, u kterých působením biologických činitelů, působením vnějšího okolí a hydrolýzou, dochází k úplnému nebo částečnému rozpadu, se začaly zkoumat v druhé polovině šedesátých let. Největší rozvoj však zažívají až poslední dvě desetiletí, kdy dochází k vývoji řady syntetických biologicky odbouratelných polymerů a především také vznikají nové biomedicínské technologie a metody (tkáňové inženýrství, regenerační medicína, genová terapie, kontrolované dodávky léčiv a bionanotechnologie), ve kterých biodegradabilní polymerní materiály mohou naleznout své uplatnění [33].

Biodegradabilní polymerní materiály jsou buď syntetické, nebo biologické. Synteticky připravované biodegradabilní polymerní materiály jsou připravovány v laboratorních podmínkách a jsou u nich sledovány přesné parametry výroby. Přírodní biologicky odbouratelné polymery jsou výsledkem syntézy, která se vyvíjela během několika milionů let. K takovým polymerům se řadí proteiny, nukleové kyseliny, polysacharidy nebo lipidy [27].

Je důležité, aby biodegradabilní polymerní materiál byl po celou svou životnost biokompatibilní, a to ať jako celistvý implantát, tak také v podobě degradačních zbytků. Některé důležité vlastnosti lze shrnout do následujících bodů [27]:

- materiál by neměl vyvolávat trvalou ani dočasnou zánětlivou nebo toxickou reakci,
- materiál by měl mít přijatelnou dobu skladovatelnosti,
- degradace materiálu by měla odpovídat době procesu hojení nebo regenerace,
- materiál by měl mít vhodné mechanické vlastnosti,
- degradační zbytky by měly být z organismu vyloučeny a neměly by se v něm kumulovat,
- materiál by měl mít snadno ovlivnitelné vlastnosti při výrobě.

Vnitřní parametry ovlivňující biokompatibilitu jsou: tvar, velikost, chemické složení povrchu, energie povrchu, hydrofobnost/hydrofilnost, drsnost, morfologie, pórovitost, uspořádání, sterilita, doba kontaktu a degradace [27, 30]. Vnější parametry jsou: druh hostitele, genetická predispozice, umístění implantátu a mikroprostředí okolo implantátu [30].

Testy biokompatibility jsou zkoumány pomocí analytické chemie, následují testy *in vitro*, testování na zvířatech a v konečné fázi testy *in vivo* na lidech. Testy biokompatibility tvoří pouze část z celkového posouzení výsledného implantátu, který se testuje také například na mechanickou stabilitu a celkovou funkčnost. Materiály, které úspěšně projdou veškerými testy, jsou charakterizovány jako biokompatibilní a lze je využít pro výrobu implantátů a jiných medicínských produktů [34].

Podobnému bezpečnostnímu zkoumání jsou podrobeny i biologicky odbouratelné polymery. V místě implantace se látka degraduje na neškodné produkty. Posouzení, zda je látka bezpečná, vyžaduje sérii testů zahrnujících *in vitro* a *in vivo* testy. Testy jsou zaměřeny na cytotoxicitu, alergické reakce, dráždivost a systémovou a chronickou toxicitu [30].

Jak syntetické, tak biologické polymery byly rozsáhle zkoumány jako biodegradabilní polymerní biomateriály. Biodegradace těchto materiálů zahrnuje štěpení hydrolyticky nebo enzymaticky určitých vazeb v polymeru, které vedou k degradaci materiálu. Z tohoto hlediska lze biodegradabilní polymerní materiály rozdělit na hydrolyticky degradovatelné

polymery (polyglykolid, polylaktid, polykaprolakton) a na enzymaticky odbouratelné polymery (kolagen, elastin, fibrin) [35].

Rychlost enzymaticky odbouratelných polymerů je závislá na místě, ve kterém se materiál nachází a na koncentraci enzymů v okolí. Chemická modifikace těchto enzymů může výrazně ovlivnit jejich vlastnosti, a to především rychlost degradace. Většinou jsou tyto polymery přírodního původu [27].

Naopak synteticky vyráběné polymerní materiály jsou obecně biologicky inertní. Jejich výhodou je kontrolovatelná výroba, u které lze ovlivnit jejich vlastnosti, a tím může vzniknout materiál, který je přesně na míru danému problému. Hydrolyticky degradovatelné polymerní materiály jsou většinou preferovány jako implantáty [27].

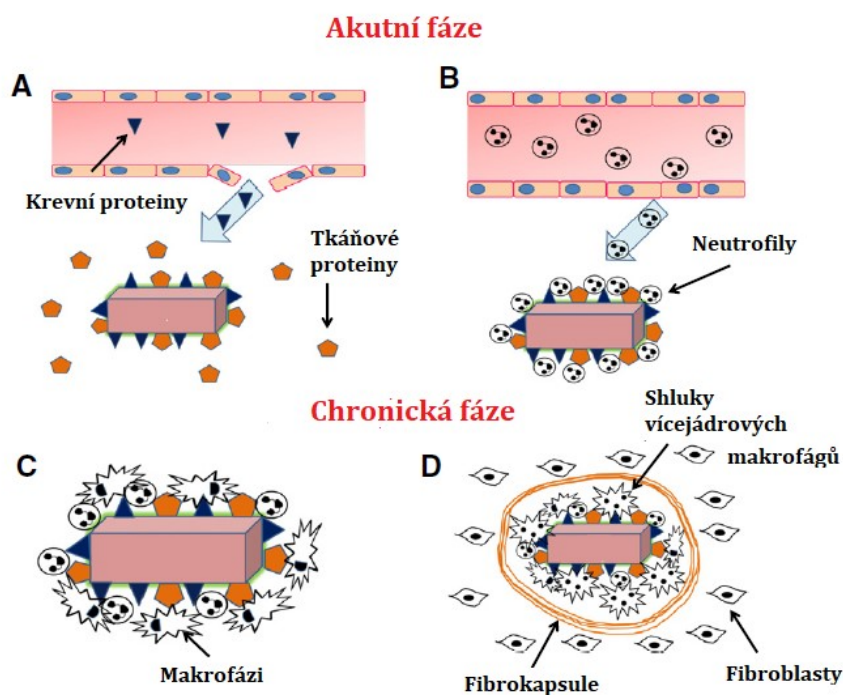
Biodegradabilní polymerní materiály se v současnosti zkoumají jako dočasné tělní implantáty, nosiče léčiv a genů nebo také jako lešení pro tkáňové inženýrství. K nejčastěji využívaným syntetickým biodegradabilním polymerním materiálům se řadí polylaktid, polyglykolid, polykaprolakton nebo polyvinylalkohol.

4.4 Reakce na implantát

Implantace biomateriálu vede k zánětlivé reakci. Reakce vzniká za účelem zabránění poškození tkání, izolaci a odstranění cizího materiálu, a zahájení opravných procesů. Tento proces lze rozdělit na dvě fáze, akutní a chronickou.

Akutní zánětlivá reakce – tato fáze může trvat několik hodin nebo dní. Vyznačuje se nejprve tvorbou vrstvy bílkovin na povrchu biomateriálu. Tento film je složen z krve a proteinů odvozených z tkání, které jsou tvořeny albuminem, fibrinogenem, komplementními fragmenty a nespecifickými protilátkami. Film je prostředníkem interakce hostitel-tkáň a je základem formování reakce na cizorodé těleso. Implantační procedura současně vede k mikrovaskulárnímu a tkáňovému poškození, což vede k uvolnění histaminu a protizánětlivého cytokinu z lokálních mastocytů. Toto iniciuje migraci neutrofilů a monocytů směrem k implantátu. Tento proces zvyšuje zánět vylučováním dalších prozánětlivých cytokinů a indikuje angiogenezi sekrecí angiogenních faktorů. Tato neovaskularizace je nezbytná pro tvorbu granulační tkáně a zahrnutí implantátu do hostitele [30].

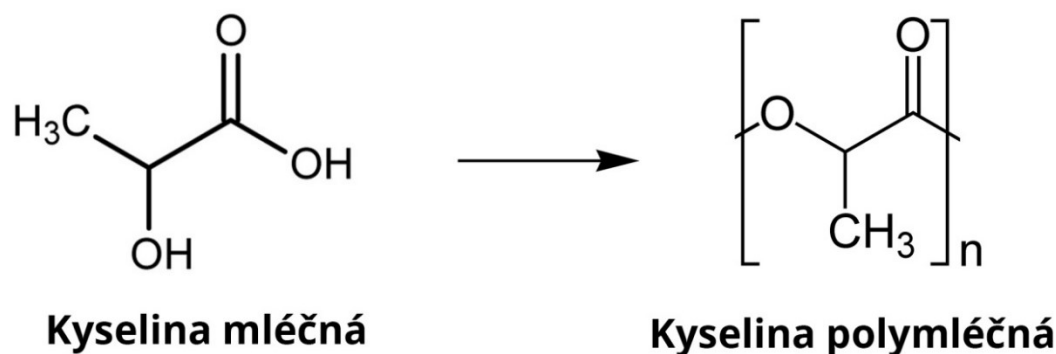
Chronická zánětlivá reakce – po reakci akutní fáze jsou neutrofily nahrazovány monocyty. Po jejich přilnutí k implantátu se diferencují na makrofágy. Makrofágy se nacházejí během prvních týdnů po implantaci a v závěrečné fázi resorpčního procesu. Tento konečný stupeň závisí na čase rozkladu specifického biologicky rozložitelného materiálu. Makrofágy jsou považovány za hlavní buněčné mediátory reakce na cizí těleso v biologicky rozložitelných materiálech a koordinují komplexní buněčnou reakci, která integruje zánětlivé cytokiny, chemokiny, růstové faktory a složky komplementu s různými typy buněk, včetně jiných makrofágů, neutrofilů, lymfocytů, endotelových buněk a fibroblastů. Pokud se makrofágům nedaří odstranit cizí materiál z těla, slučují se do obřích buněk okolo objektu. Tato spojitá vrstva zapouzdří biomateriál, a tím chrání hostitele před tímto biomateriálem. Nakonec tento proces vede k tvorbě vysoce vláknité a avaskulární kapsle, čímž se dále izoluje biomateriál. Tyto buňky degradují biodegradabilní materiál s časem a jejich počet se postupně snižuje [30]. Celý proces je popsán na obrázku 13.



Obrázek 13. Schéma akutní a chronické fáze reakce na cizí objekt [30].

4.5 Polylaktid (PLA)

Polymléčná kyselina (PLA) neboli polylaktid, obrázek 14, je polyester kyseliny mléčné nebo také 2-hydroxypropionové kyseliny. Jedná se o jeden z nejrozšířenějších biodegradabilních polymerů současné doby. Vlastnosti polylaktidu ho činí vhodným materiálem pro potenciální medicínské a farmaceutické aplikace. Kyselina polymléčná má srovnatelné vlastnosti s polymery na bázi ropy, jako je například vysoká pevnost, průhlednost, modul pružnosti apod.



Obrázek 14. Struktura polymléčné kyseliny.

Monomer kyseliny mléčné se vyskytuje ve dvou opticky aktivních formách L-formě a D-formě. Formy samostatně vykazují jistou míru krystalinity (L-forma až 37%), zatímco racemický roztok vede k amorfnímu polymeru. Polylaktid (PLA) se vyskytuje ve třech formách: PLLA, PDLA a PDLLA, nejčastěji ve formě PDLLA, kde je velmi důležitý stereochemický poměr L a D izomeru v původním monomeru kyseliny mléčné. Tento poměr udává konečné vlastnosti polymeru, jeho rozložitelnost, a také určuje míru krystalinity PLA. Čím více L izomeru se vyskytuje v kyselině mléčné, tím více je konečný polymer krystalického charakteru, ostatní formy s nižší optickou čistotou jsou převážně amorfnějšího charakteru [36].

Polylaktid je čirý a bezbarvý termoplast. Jeho fyzikální vlastnosti jsou závislé především na teplotě skelného přechodu, která se pro jednotlivé formy PLA liší (tabulka 4). PLA má nižší teplotu tání a teplotu skelného přechodu, než například polyethylentereftalát (PET) a polystyren (PS), a proto je zkoumáno jeho využití pro různá tepelná těsnění.

PLA je zcela rozpustný v dichlormethanu, chloroformu, acetonitrilu nebo dioxanu a nerozpustný v alkoholech a ve vodě [37]. Teplota skelného přechodu PLA je mezi 55-60°C. K tání dochází při 175°C [18,21], teploty přechodu a tání jednotlivých forem jsou uvedeny v tabulce 4. PLA má velmi dobré biokompatibilní vlastnosti. Nevýhodou PLA je nadměrná křehkost a pomalá krystalizace [30].

Tabulka 4. Vlastnosti PLA

Forma PLA	PLLA	PDLLA	PDLA
Teplota skelného přechodu [°C]	55-80	43-53	40-50
Teplota tání [°C]	172-178	120-170	120-150

Mechanické vlastnosti jsou ovlivněny mnoha parametry, jako je například krystalinita, molekulová hmotnost, postup výroby a konečné zpracování. PLA může být měkký a elastický materiál, ale také tuhý a pevný polymer [38]. Modifikací PLA pomocí plniva, lze upravit a vylepšit jeho vlastnosti natolik, aby vznikl stabilní a biokompatibilní polymerní materiál, který lze využívat v širokém spektru medicínských aplikací.

PLA vzniká syntézou z monomeru kyseliny mléčné. Jedná se o vícestupňový proces, který začíná produkcí kyseliny mléčné a končí její polymerací. Polylaktid se nejčastěji vyrábí pomocí polymerace s otevřením kruhu neboli ROP metody. Touto metodou je možné syntetizovat PLA s vysokou molekulovou hmotností.

Doba degradace PLA se pohybuje mezi 12-16 měsíců. Doba degradace je rovněž ovlivněna hydrofobním chováním PLA a molekulovou hmotností. PLA ztrácí už po šesti měsících své vlastnosti, je-li podroben hydrolýze. Pomocí různých kopolymerů lze tuto dobu zkrátit či prodloužit dle požadavků [27, 30].

Polymléčná kyselina se v těle rozkládá hydrolyticky náhodným zanikáním esterových vazeb. Vzniká mléčná kyselina, jež se následně rozkládá v citrátovém cyklu na oxid uhličitý a vodu [30]. Využívá se v mnoha aplikacích, například jako obalový materiál, materiál v zemědělství, v medicíně, textilním průmyslu a tkáňovém inženýrství [38].

4.6 Polyvinylalkohol (PVA)

Polyvinylalkohol (PVA) je bílá látka práškovitého charakteru. PVA se označuje pomocí dvou čísel (PVA X-Y). X označuje viskozitu 4 % vodného roztoku při laboratorní teplotě (20 °C), jako relativní indikátor molární hmotnosti. Y označuje stupeň hydrolyzy [39]. Fyzikální a mechanické vlastnosti polyvinylalkoholu jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5. Vlastnosti PVA [39, 40]

Vlastnosti	
Vzhled	Bílý granulovaný prášek
Specifická hmotnost	1,27 – 1,31
Pevnost v tahu (MPa), (98-99 %	67–100
Pevnost v tahu (MPa), (87-89 %	24–79
Prodloužení (%)	0–300
Specifické teplo (J/gK)	1,67
Tepelná vodivost (W/mK)	0,2
Teplota skelného přechodu (K)	358 (98-99 % hydrolyzovaný)
Teplota tání (K)	503 (98-99 % hydrolyzovaný)
Měrný odpor ($\Omega \cdot \text{cm}$)	$(3,1-3,8) \cdot 10^7$
Index lomu (n_D 20 °C)	1,55
Stupeň krystality	0-0,54
Hořlavost	Hoří podobně jako papír
Stabilita na slunečním světle	Vynikající

4.6.1 Příprava

PVA se připravuje polymerizací vinylacetátu radikálovou řetězovou polymerizací, nejčastěji v methanolu. Polyvinylacetát, jenž je rozpuštěný v methanolu, je přeměněn na polyvinylalkohol hydrolýzou. Hydroxid sodný je zde užit jako katalyzátor [40].

Jelikož je hlavní řetězec polyvinylalkoholu tvořen pouze uhlíkovými atomy, je jeho štěpení možné pouze oxidací. Enzymaticky lze PVA rozložit dvěma způsoby. Oxidázou a dehydrogenázou, které reagují na hydroxylové skupině a mění ji na skupinu karboxylovou a opakováním oxidace na další hydroxylové skupině tvoří diketon a řetězec se následně rozštěpí [41].

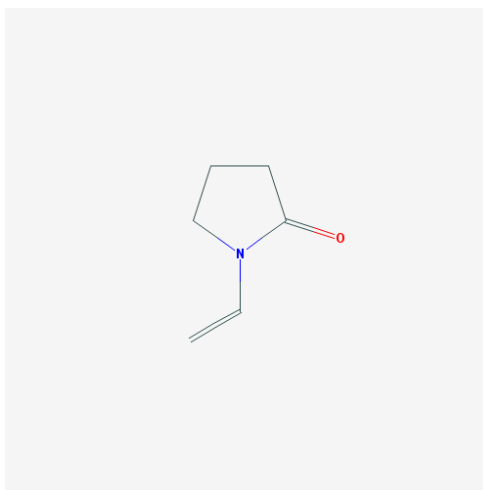
4.6.2 Aplikace

Polyvinylalkohol se využívá hlavně jako zahušťovadlo tuší, inkoustů a razítkových barev, k přípravě lepidel, pro impregnaci papíru proti tukům a rozpouštědlům. V textilním průmyslu a pro výrobu ochranných prostředků. Rovněž se užívá pro různé speciální účely, obalový materiál, který se spolu s obsahem rozpustí ve vodě [42].

4.7 Polyvinylpyrrolidon (PVP)

Polyvinylpyrrolidon (PVP) je syntetický ve vodě rozpustný polymer, ve formě bílého prášku, vyrobený z monomeru N-vinylpyrrolidonu, viz obrázek 15. Používá se nejčastěji jako pojivo ve farmaceutických tabletách, ale i v mnoha jiných technických aplikacích s různými funkcemi, jako lepidlo, či přidaný emulgátor. Rovněž se užívá i v některých očních kapkách jako lubrikant [43].

PVP s jódem tvoří komplex, který má, díky přítomnému jódu, dezinfekční vlastnosti. Molekulová hmotnost je 111,144 g/mol, je bez zápachu, bod tání je 13 °C a bod varu je 90-93 °C. Je rozpustný ve vodě a ethanolu. Vlastnosti polyvinylpyrrolidonu jsou uvedeny v tabulce 6.



Obrázek 15. N-vinylpyrrolidon [43].

Tabulka 6. Vlastnosti PVP [43].

Vlastnosti	
Vzhled	Bílý hydroskopický amorfní prášek
Molární hmotnost [g/mol]	111,114
Vůně	Bez zápachu
Teplota tání [°C]	13-13,9
Teplota varu [°C]	148
Rozpustnost [mg/ml]	100 (při 0 °C)
Hustota [kg/m ³]	1,23-1,29
Teplota skelného přechodu [°C]	110-180
Samovznícení [°C]	364

4.7.1 Příprava

Polyvinylpyrrolidon se připravuje Reppeovým postupem. 1,4-butandiol získaný Reppe-butadienovou syntézou se dehydrogenuje s využitím mědi při teplotě 200 °C, za vzniku γ -butyrlaktonu. Reakcí s amoniakem se získá pyrrolidon. Následným zpracováním s acetylénem vzniká vinylpyrrolidonový monomer [43].

5. Praktická část

Tato práce má za cíl studovat možnosti uplatnění kurkuminu v biomedicínských aplikacích, zvláště při hojení a léčbě chronických ran. Z důvodu jeho vlastností, zejména nízké rozpustnosti ve vodě a rychlé metabolické přeměně, se kurkumin obtížně využívá samostatně jako čistá látka. Za nejperspektivnější spojení lze považovat materiál fibrin/kurkumin [28], kdy pozitivní vlastnosti kurkuminu jsou posíleny působením fibrinu na lidský organismus.

Avšak z finanční náročnosti, nedostatku prostoru a vybavení, jakož i složitosti přípravy a následné charakterizace vzniklých produktů, byla pozornost zaměřena na zkoumání vlastností kurkuminu ve spojení s jinými polymery. Tyto polymery byly pro prvotní zkoumání v rámci bakalářské práce výhodnější z hlediska snadné přípravy kompozitů.

Pro účely zkoumání byly použity tři biokompatibilní polymery polylaktid, polyvinylalkohol a polyvinylpyrrolidon.

5.1 Chemikálie

- Kurkumin, Sigma-Aldrich
- Polylaktid ve formě granulí, Plasty Mladeč
- Polyvinylalkohol, Sigma-Aldrich
- Polyvinylpyrrolidon, Sigma-Aldrich
- Dichlormethan, pro HPLC, Sigma-Aldrich
- Kyselina sírová (zředěná 1:4), Mach chemikálie
- Hydroxid sodný ($c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), Mach chemikálie

5.2 Přístroje a vybavení

- Tryskový mlýn Sturtevant
- UV/VIS spektrometr LAMBDA 11
- Světelný digitální mikroskop VHX (Keyence Corporation, Japan)
- Skenovací elektronový mikroskop Quanta 450 FEG (FEI)
- FTIR spektrometr Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Scientific, USA)
- POLARON SC 7640 – naprašovačka
- Přístroj na laserovou difrakci HORIBA Nanopartica SZ-100
- Rentgen RIGAKU, Cu lampa (energie 8,04 keV, vlnová délka 15,406 nm), napětí 40 kV, proud 40 mA, K- β filtr, scintilační detektor
- Analytické váhy, Tecator 6110
- pHmetr inoLab pH 730
- Ultrazvuková vana VWR ultrasonic cleaner
- Elektronická pipeta BIOHT 0,5-5 ml
- Skleněné Petriho misky
- Skleněné vialky
- Kádinky

5.3 Příprava vzorků

Dodaný kurkumin (CUR) byl dvakrát pomlet na tryskovém mlýnu Sturtevant. Hnací tlak byl 50 psi, tlak v mlýnu 50 psi. Z původní navážky 23 g bylo získáno 7,5 g pomletého kurkuminu. Při mletí docházelo k velkým ztrátám materiálu, zejména nejjemnějších částic ve vznosu. Následně byly pomletý a původní vzorek charakterizovány pomocí laserové difrakce pro zjištění distribuce velikostí částic. Všechny vzorky kompozitů byly připravovány z pomletého kurkuminu.

5.3.1 Příprava kompozitu polylaktid + kurkumin

Kompozit polylaktid + kurkumin (PLA+CUR) byl připraven ze dvou 2 g granulovaného PLA, který byl přidán do 18 ml dichlormethanu (DCM). Následně byla směs homogenizována pomocí ultrazvuku po dobu 30 minut. Po úplném rozpuštění bylo přidáno určité množství (tabulka 7) kurkuminu (mletého). Směs byla následně homogenizována pomocí ultrazvuku, viz. tabulka 7. Připravené vzorky, obsah plniva a doba homogenizace jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7. Série vzorků PLA+CUR.

Vzorek	PLA [g]	DCM [ml]	CUR [g]	Ultrazvuk [min]
1	2	18	0	0
2	2	18	0,0317	30
3	2	18	0,0896	120
4	2	18	0,1469	120

Takto připravené vzorky byly umístěny na Petriho misky v digestoři pro vytěkání přebytečného dichlormethanu. Připravené vzorky byly posléze podrobeny charakterizaci, za účelem poznání morfologie, homogenity, rozložení plniva a rychlosti degradace.

5.3.2 Příprava kompozitu polyvinylalkohol + kurkumin

Kompozit na bázi polyvinylalkoholu plněného kurkuminem (PVA+CUR) byl připraven z 1 g PVA a 12 ml deionizované vody. Polyvinylalkohol byl rozpuštěn ve vodě a následně byl přidán kurkumin. Vzhledem ke nízké rozpustnosti kurkuminu ve vodě, bylo třeba nechat rozpustit všechny PVA před přidáním kurkuminu. Pro lepší homogenizaci vzorku byla směs intenzívně míchána, jelikož pomocí ultrazvuku nebyla homogenizace dostatečná. Vzorky byly poté sušeny, ve formě tenkého filmu, na teflonové pánvi při teplotě 85 °C. Teflonová pánev byla použita pro účely snadného sundání filmu vzorku z povrchu. V tabulce 8 je uvedena připravená série vzorků.

Tabulka 8. Série vzorků PVA+CUR.

Vzorek	PVA [g]	Voda [ml]	CUR [g]
1	1	12	0,0240
2	1	12	0,0503
3	1	12	0,0872
4	1	12	0,1450

Při přípravě nedošlo k dostatečné homogenizaci kurkuminu v PVA, z důvodu nízké disperze kurkuminu ve vodném prostředí.

5.3.3 Příprava kompozitu polyvinylpyrrolidonu

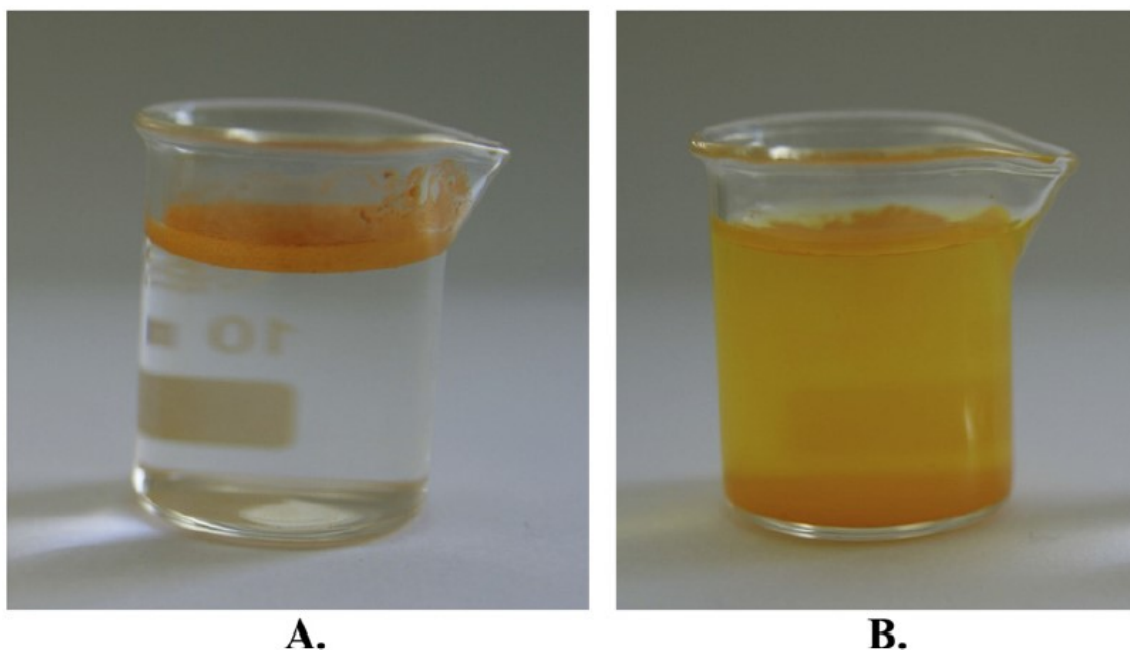
Kompozit na bázi polyvinylpyrrolidonu a kurkuminu (PVP+CUR) byl připraven z 10 ml vody a 1-4 g polyvinylpyrrolidonu, viz. tabulka 9. Vzorky byly homogenizovány pomocí ultrazvuku, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění polyvinylpyrrolidonu. Série připravených vzorků polyvinylpyrrolidonu je uvedena v tabulce 9.

Tabulka 9. Série vzorků polyvinylpyrrolidonu.

vzorek	PVP [g]	Voda [ml]
1	1	10
2	2	10
3	3	10
4	4	10

Snaha připravit vrstvu polyvinylpyrrolidonu na skle, hliníku a teflonu, se ukázala být neúspěšná. Polyvinylpyrrolidon zbavený vody se stává extrémně křehkým a pohlcuje vzdušnou vlhkost. Z tohoto důvodu, nebyly kompozity PVP+CUR připraveny. Ze studie [44] vyplývá, že polyvinylpyrrolidon dokáže potlačit hydrofobní efekt kurkuminu.

Polyvinylpyrrolidon je tedy ideálním prostředkem, jak zajistit dispergovatelnost kurkuminu ve vodném roztoku (Obrázek 16). Bude však nutné použít rovněž jiného polymeru pro zvýšení pevnosti struktury.



Obrázek 16. A kurkumin ve vodě, B pomletý kurkumin ve 2 hm % roztoku polyvinylpyrrolidonu ve vodě [37].

5.4 Charakterizace

Jak bylo uvedeno výše, pro většinu analýz charakterizujících vzniklý materiál byl použit kompozit PLA+CUR, který se jeví jako jeden z nejvhodnějších polymerů pro biomedicínské aplikace. Byly rovněž provedeny testy degradability PVA+CUR ve vodě o různém pH, avšak rozklad probíhal velmi rychle, a to tak, že proces nebylo možno zaznamenat.

5.4.1 Antibakteriální testy

Testy byly provedeny na Přírodovědecké fakultě Ostravské univerzity, na katedře biologie a ekologie. Testy prováděl tým paní profesorky Malachové.

Antibakteriální aktivita kurkuminu byla zkoumána metodou minimální inhibiční koncentrace (MIC). Metoda spočívá v přípravě Petriho misek s agarem a kulturou, následuje koncentrační naředění kurkuminu v ethanolu, vždy v poměru 1:1 z předešlého naředění. Takto byl získán definovaný koncentrační spád. Dále byly připraveny tři

srovnávací vzorky, kontrola rozpouštědla (ethanol), pozitivní kontrola (kultura a ethanol v médiu bez antibiotik) a negativní kontrola (médiu bez bakterií a roztok čistého kurkuminu, mletého tryskovým mlýnem). Poté byly kultury inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Po uplynutí této doby byly detekovány antibakteriální účinky kurkuminu a nedostatek zákalu (důkaz inhibice růstu bakterií). Koncentrace v misce s nejvyšším ředěním bez zákalu je definována jako hodnota MIC [45].

5.4.2 Degradace v roztocích (UV/VIS)

Kompozit PLA+CUR byl dále podroben pozorování jeho rozkladu a zjišťování množství uvolněného kurkuminu. Definované části kompozitu (čtverec o obsahu 1 cm²) byly umístěny do vodných roztoků o hodnotách pH 4, 7 a 10 při laboratorní teplotě po dobu 35 dnů. Pomocí UV/VIS spektrometrie byla sledována přítomnost kurkuminu ve vodném roztoku, který se mohl uvolnit z připravených materiálů důsledkem degradace polymerní matrice v prostředí o daném pH. Po skončení testů byly vzorky PLA+CUR podrobeny charakterizaci pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM).

Vodné roztoky o různém pH byly připraveny pomocí pH metru. K přípravě roztoků byla použita demineralizovaná voda, kyselina sírová 1:4 a roztok hydroxidu sodného 0,1 (c = 1 mol.dm⁻³). Roztoky nebyly nijak pufrovány. Pro účely pokusu bylo užito vzorku 4. PLA+CUR s největší koncentrací kurkuminu. V Tabulce 12. jsou uvedeny hodnoty pH vzorků v den jejich měření. Pravidelně každý týden byla odebrána ze vzorků vodná fáze a byla zjišťována přítomnost kurkuminu metodou UV/VIS. Vzorky PLA+CUR byly následně z roztoků vyjmuty a charakterizovány pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM).

6. Výsledky

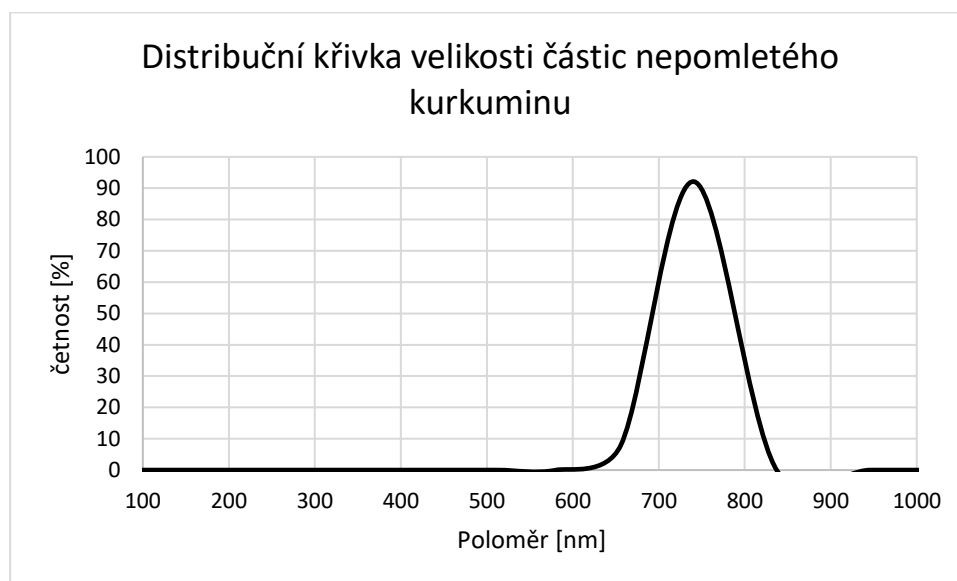
6.1 Vyhodnocení výsledků

6.1.1 Měření distribuce velikosti částic

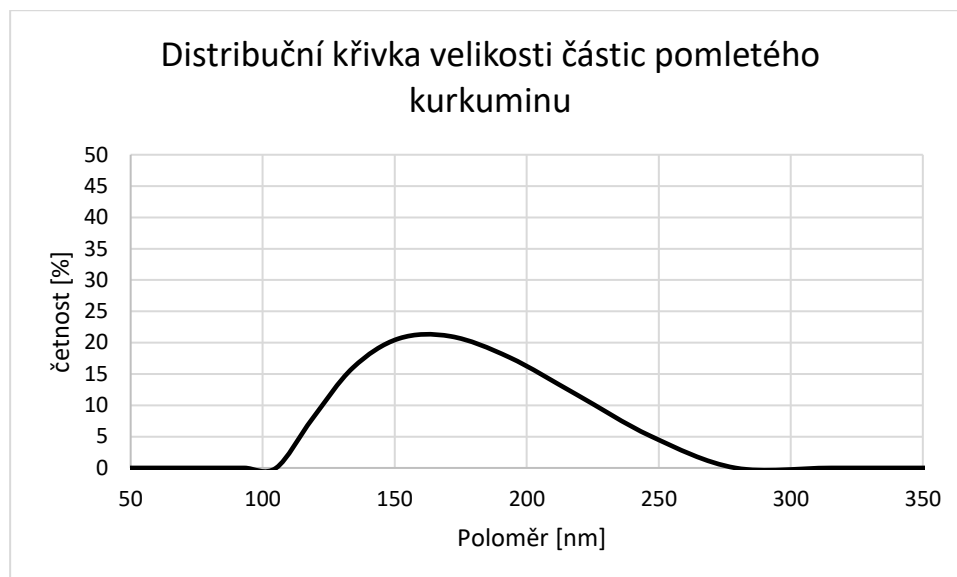
Průměrná velikost částic je uvedena v tabulce 10. Na obrázcích 17 a 18 lze vidět grafické rozložení distribuce velikosti částic.

Tabulka 10. Průměrná velikost částic.

Vzorek	Průměrná hodnota souboru [nm]	Nejčastější hodnota souboru [nm]
Nepomletý CUR	690,7	693,4
Pomletý CUR	160,4	159,7



Obrázek 17. Distribuce velikostí částic nepomletého kurkuminu.



Obrázek 18. Distribuce velikostí částic pomletého kurkuminu.

Z obou distribučních křivek je patrné, že velikost částic byla zmenšena z původní průměrné hodnoty 690 nm na 160 nm.

6.1.2 Antibakteriální testy

Účelem stanovení MIC bylo zjistit, jaká koncentrace kurkuminu je zapotřebí pro nastolení aseptického prostředí, tedy kolik kurkuminu musí kompozit minimálně obsahovat, aby se projevil antibakteriální efekt. Výsledky pokusu jsou uvedeny v tabulce 11. Bylo zjištěno, že při testování dvou různých bakteriálních kmenů se hodnota MIC liší, je tak nutné antibakteriální účinky vždy řádně testovat s ohledem na zamýšlené použití.

Tabulka 11. Výsledky MIC testů s čistým kurkuminem.

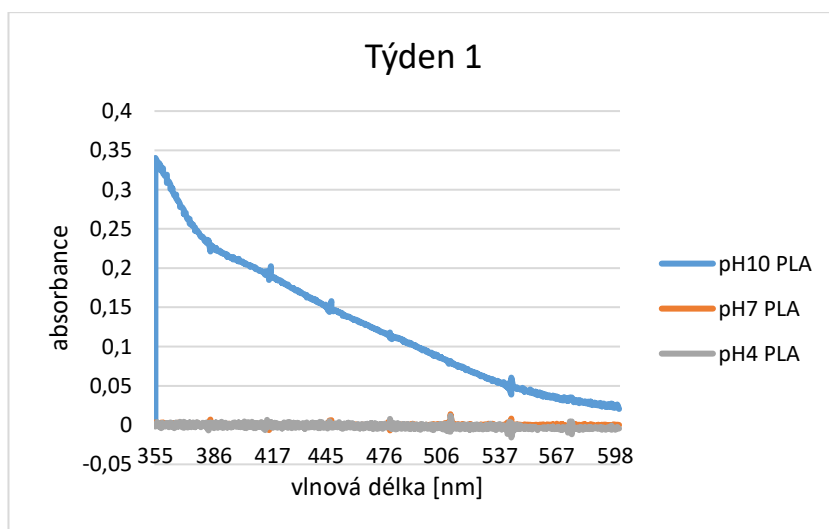
Bakterie	Koncentrace (MIC) [mg/ml]
<i>E. coli</i>	180
<i>Enterococcus faecalis</i>	300

6.1.3 UV/VIS spektrometrie

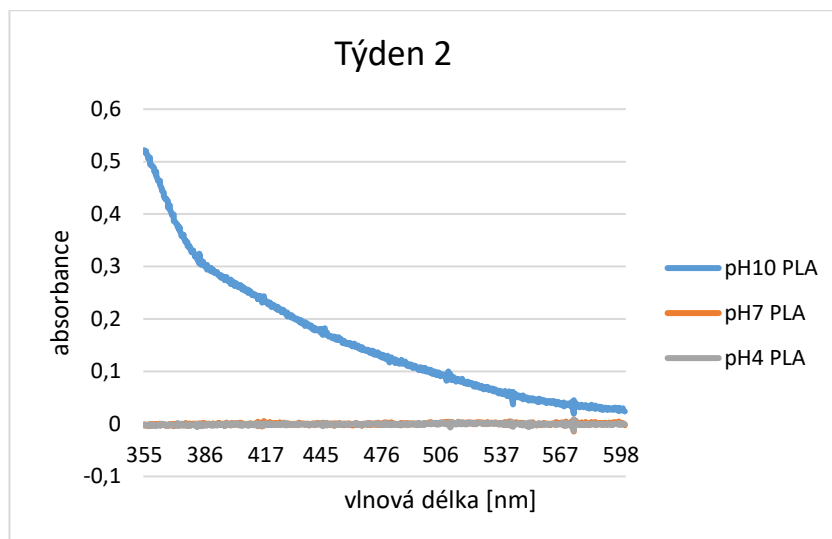
Tabulka 12. Změna pH v roztocích se vzorkem v průběhu 5 týdnů.

Týden	pH 4	pH 7	pH 10
1	4,28	6,77	9,89
2	4,75	7,10	9,56
3	4,02	7,82	9,24
4	4,32	7,30	8,98
5	4,82	7,03	9,20

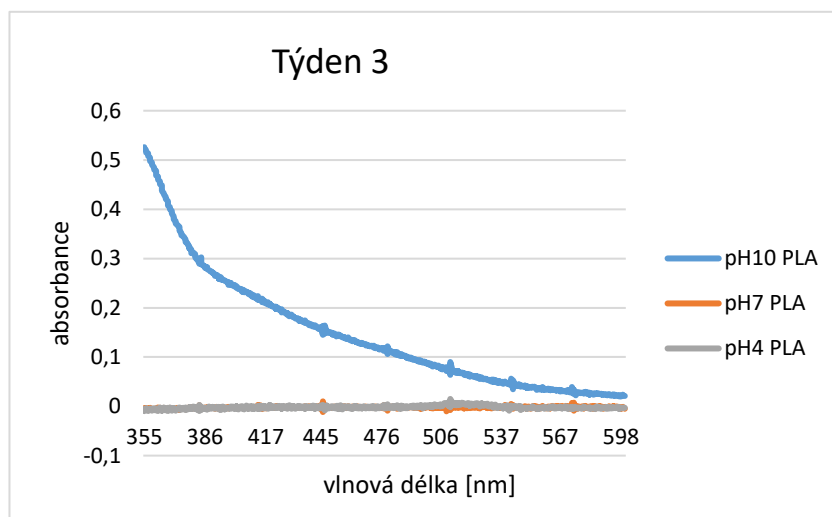
UV/VIS analýza byla prováděna v rozsahu vlnových délek 300-600 nm. Použity byly skleněné kyvety. Výsledky měření jsou znázorněny na obrázcích 19-23. Při každé UV/VIS analýze měření byla rovněž kontrolována hodnota pH roztoku pro ujištění, že nedochází ke změně, výsledky měření jsou zaznamenány v Tabulce 12.



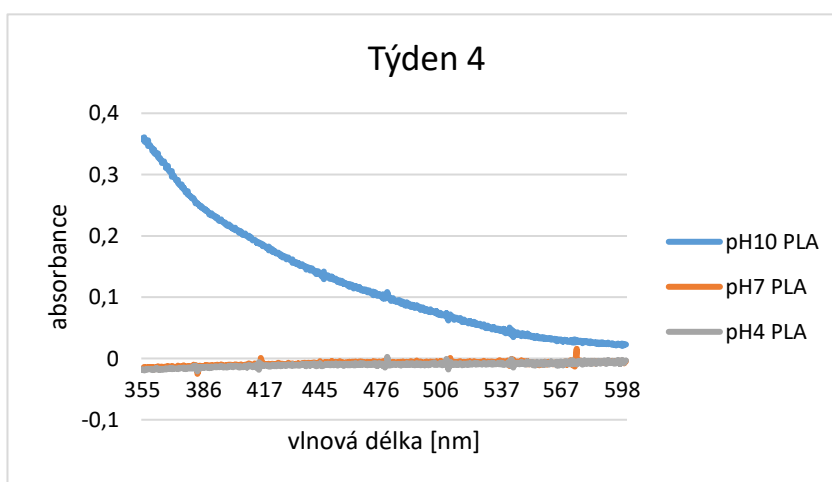
Obrázek 19. UV/VIS záznam po týdnu degradace.



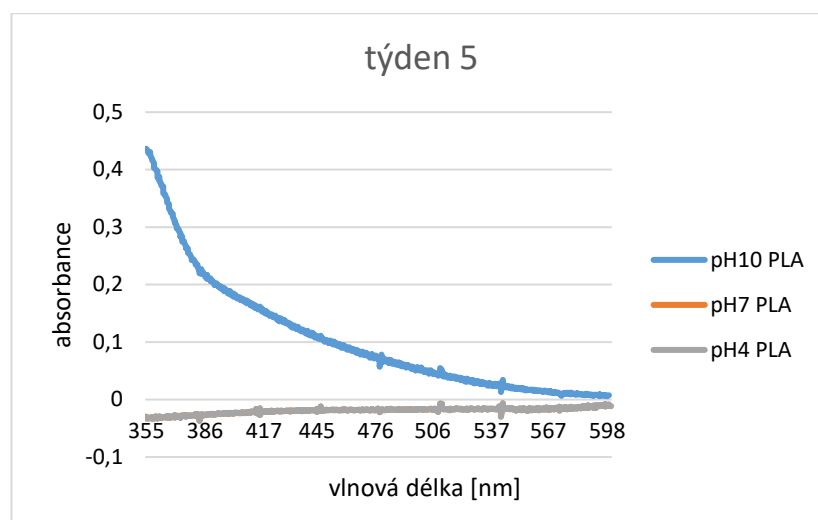
Obrázek 20. UV/VIS záznam po dvou týdnech degradace.



Obrázek 21. UV/VIS záznam po třech týdnech degradace.

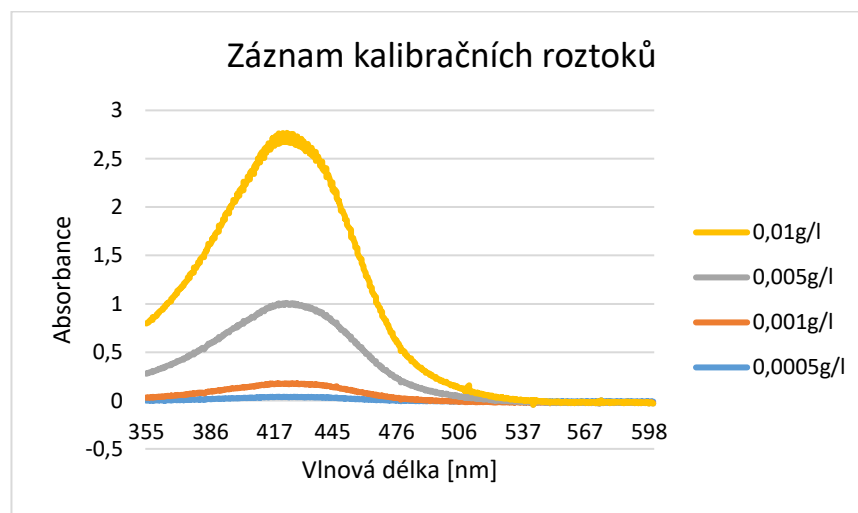


Obrázek 22. UV/VIS záznam po čtyřech týdnech degradace.



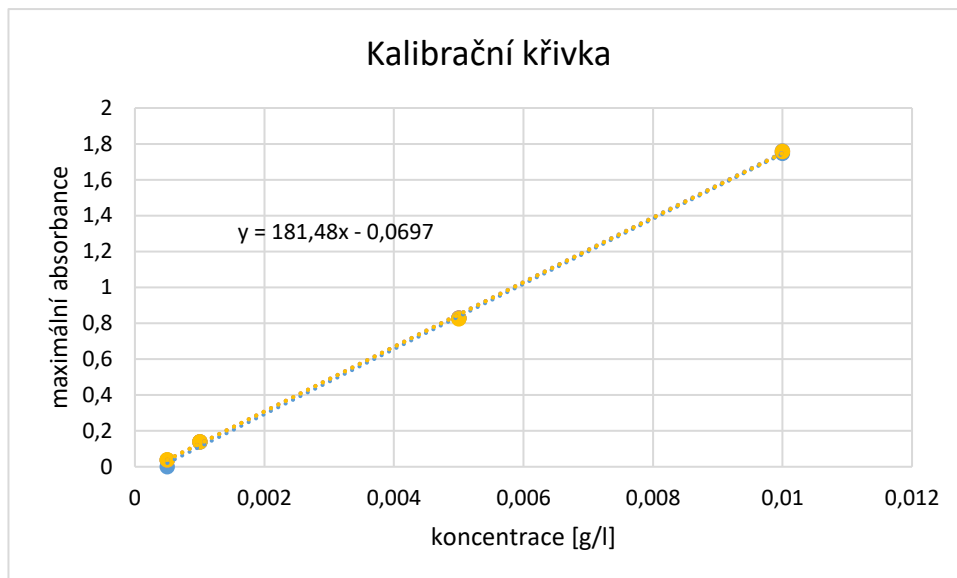
Obrázek 23. UV/VIS záznam po pěti týdnech degradace.

Jak je patrné z obrázků 19-23, během pěti týdnů nedocházelo ke zvyšování koncentrace uvolněného kurkuminu v roztocích. Uvolnil se pouze kurkumin na povrchu vzorku, a to v jen v případě roztoku o pH 10, kdy je kurkumin v enolformě a je rozpustný ve vodě. Rovněž na obrázku není vidět absorpční maximum. Z připravených roztoků kurkuminu v methanolu (záznam analýz UV/VIS pro jednotlivé koncentrace v rozsahu vlnových délek 355-600 nm, obrázek 24) byla připravena kalibrační křivka (obrázek 25). Na základě této kalibrační křivky bylo zjištěno množství kurkuminu uvolněného do vodného roztoku.



Obrázek 24. UV/VIS záznam kalibračních roztoků CUR/methanol

Obsah kurkuminu na jeden vzorek, o velikosti 1 cm^2 , vpravený do roztoku byl v průměru $0,17 \text{ mg/cm}^2$. V průměru se ze vzorku uvolnilo asi $2,69 \text{ } \mu\text{g}$. Tato hodnota se vztahuje pravděpodobně pouze k množství kurkuminu lokalizovaném na povrchu kompozitu.



Obrázek 25. Kalibrační křivka roztoků CUR/methanol

Vzorky PVA+CUR byly podrobeny testům ve vodném prostředí, aby se simulovalo prostředí lidského těla (působení enzymů bylo zanedbáno). Rychlá degradace PVA ve vodě neumožňuje jeho využití jako prostředek k implantaci, rovněž využití PVA vrstev je limitováno.

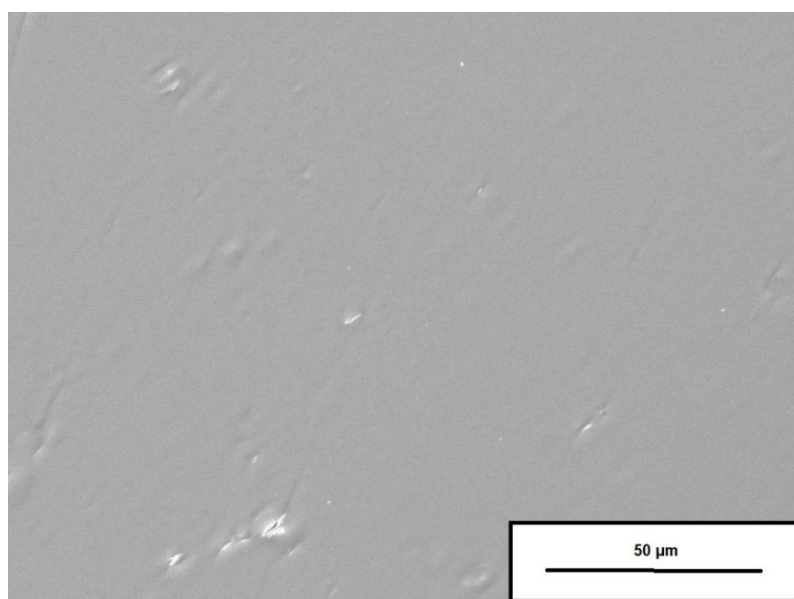
Na obrázku 26. je možno vidět rozklad PVA+CUR v roztocích o pH 2, 7 a 11. Snímek byl pořízen dvě minuty po umístění vzorků do roztoku.



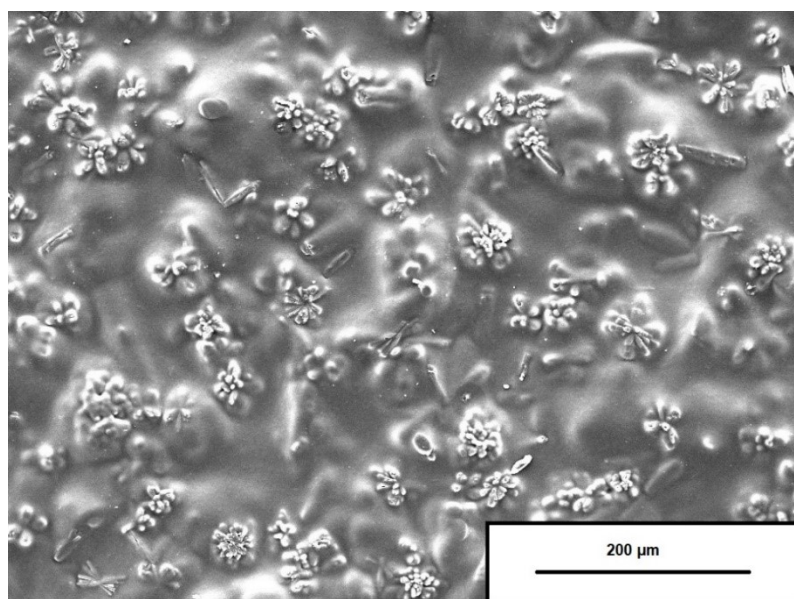
Obrázek 26. Degradace PVA+CUR ve vodě.

6.1.3 SEM

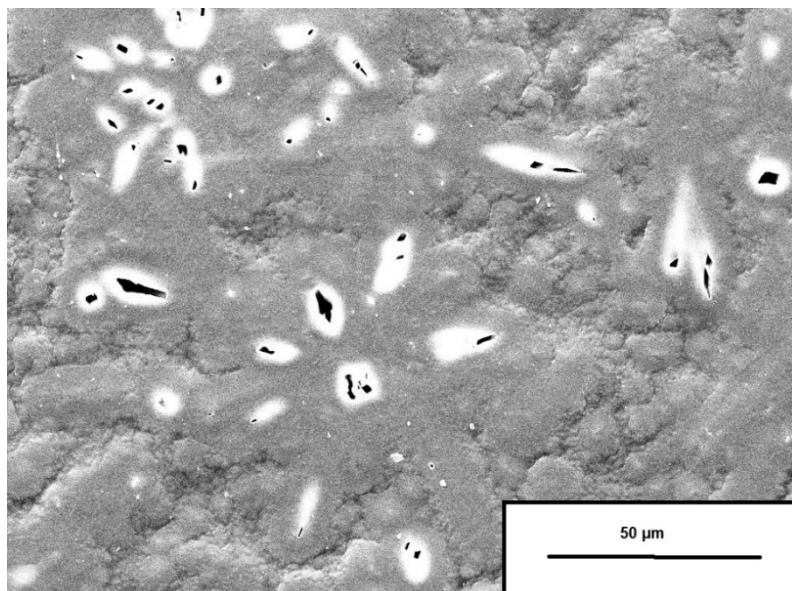
Vzorky PLA+CUR po vyjmutí z roztoků byly připraveny pro analýzu pomocí SEM. Účelem bylo zjistit morfologii povrchu vzorků před a po degradaci. Vzorky byly připraveny připevněním na vodivou uhlíkovou pásku, a vzhledem k nevodivému charakteru vzorků, byly naprášeny dvěma vrstvami zlata. Snímky byly pořízeny pomocí SE detektoru (detektor sekundárních elektronů), při urychlovacím napětí 15 kV a spot 5. Obrázky 27-32 zachycují snímky ze SEM, zobrazují čisté PLA, PLA+CUR a PLA+CUR po třech týdnech v různých vodních prostředích.



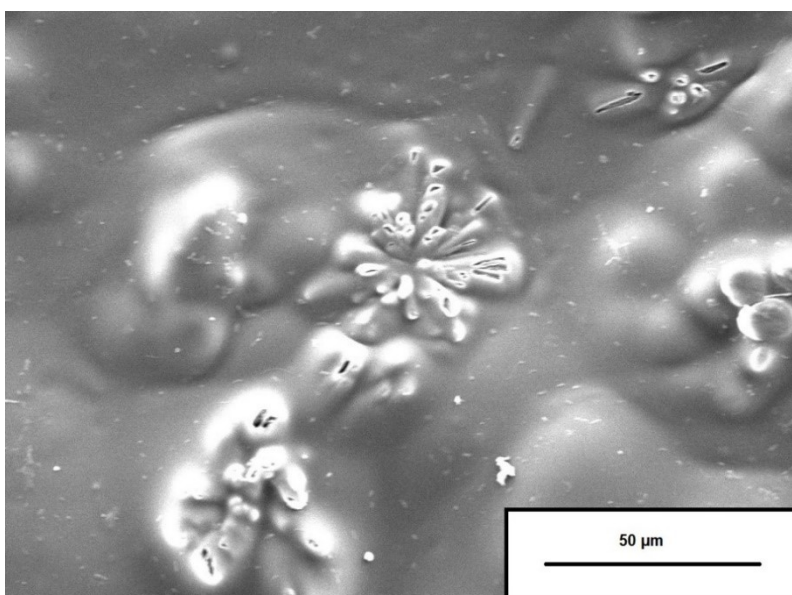
Obrázek 27. SEM snímek čistého PLA.



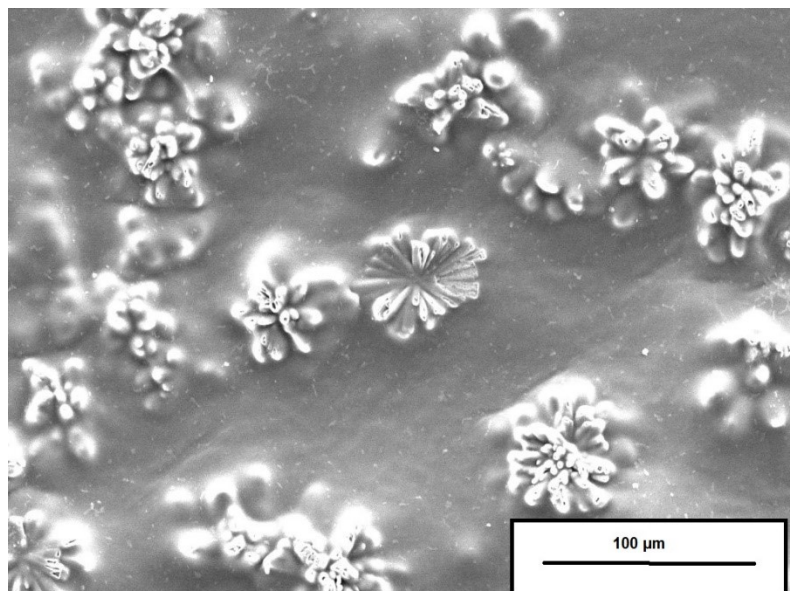
Obrázek 28. SEM snímek PLA+CUR.



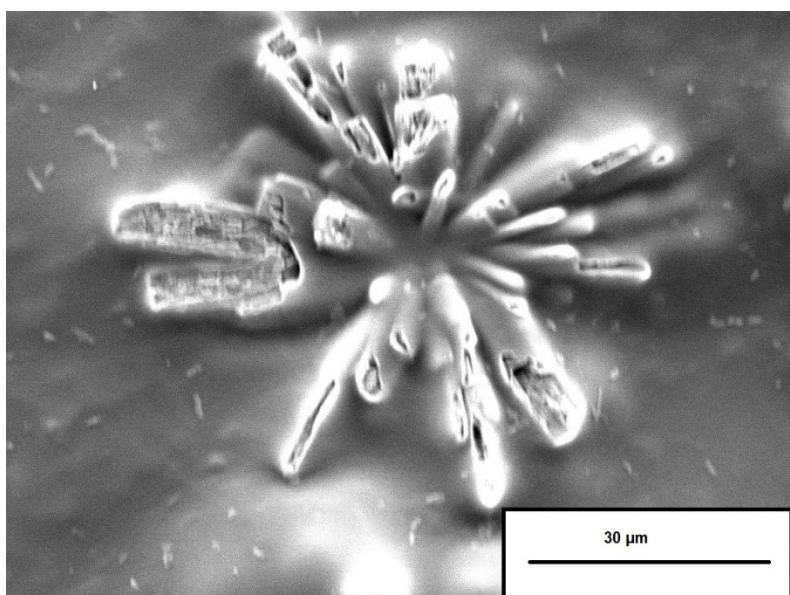
Obrázek 29. SEM snímek PLA+CUR degradace 3 týdny v pH 10.



Obrázek 30. SEM snímek PLA+CUR degradace 3 týdny v pH 7.



Obrázek 31. SEM snímek PLA+CUR degradace 3 týdny v pH 4.

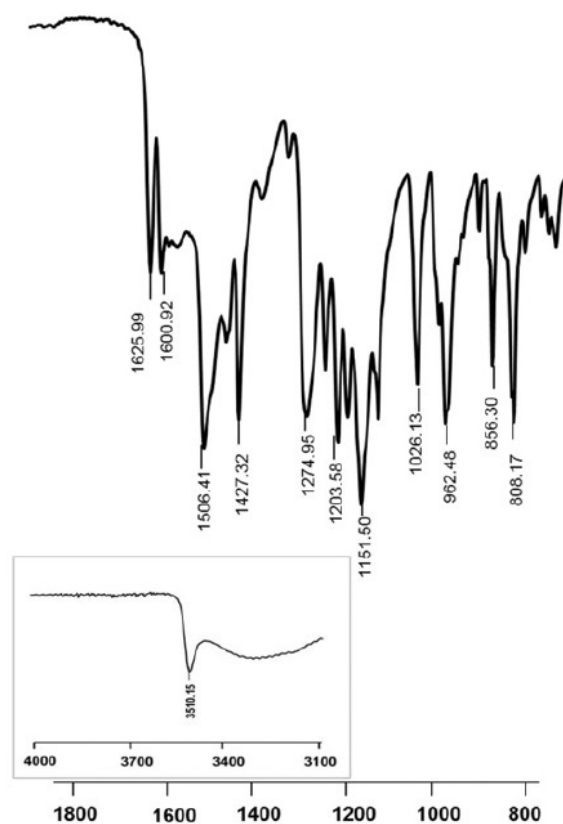


Obrázek 32. SEM snímek detail částice kurkuminu v PLA kompozitu.

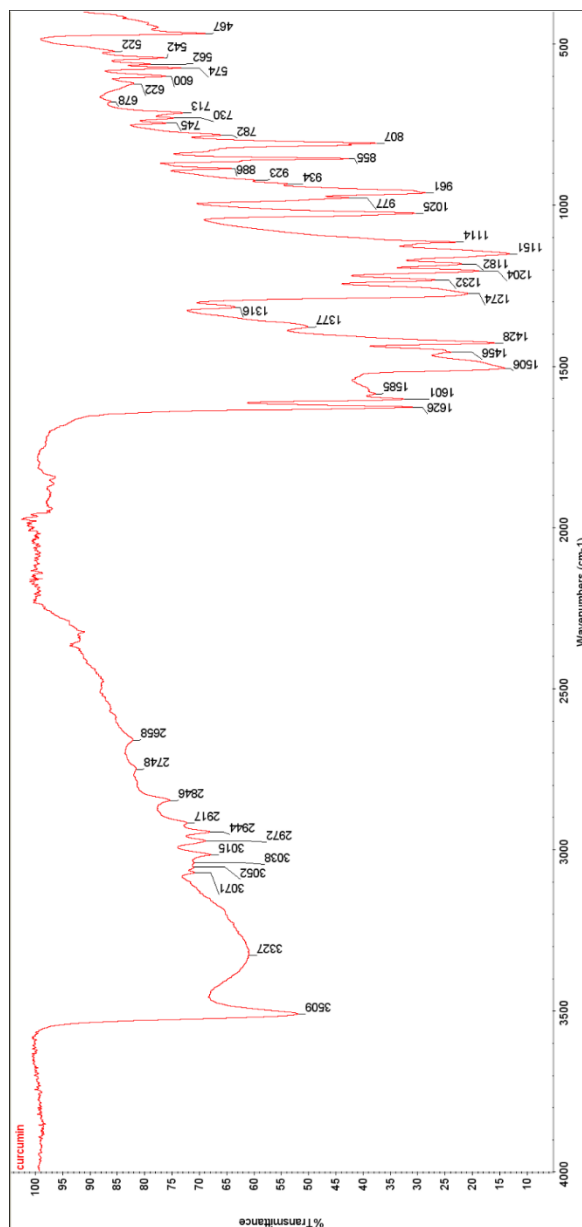
Z obrázku 28 je patné, že přidáním kurkuminu do PLA dochází k deformaci hladkého povrchu. Při porovnání obrázků 29-31 lze pozorovat příčinu aktivity roztoků, se vzorkem s pH 10, na UV/VIS spektrometrii. Povrch těchto vzorků je narušený z důvodu chybějících částic kurkuminu, které se na tomto povrchu nacházely. Rovněž lze však pozorovat na všech třech obrázcích degradaci PLA matrice.

6.1.4 FTIR

Analýza infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR), byla použita za účelem zjištění, zda při vzniku kompozitu došlo ke změně struktury a vazeb v látkách. Byl použit FTIR spektrometr s využitím ATR metody (zeslabená úplná reflektance) a s použitím diamantového ATR nástavce. Data byla zpracována v programu OMNIC. Měření probíhalo při vlnových délkách 400-4000 cm^{-1} . Spektra byla upravena pomocí autokorekce, srovnána na úrovni základní linie, a bylo odstraněno spektrum oxidu uhličitého. Na obrázcích 33 a 34 je srovnání FTIR spekter uvedených v jiných studiích [44].

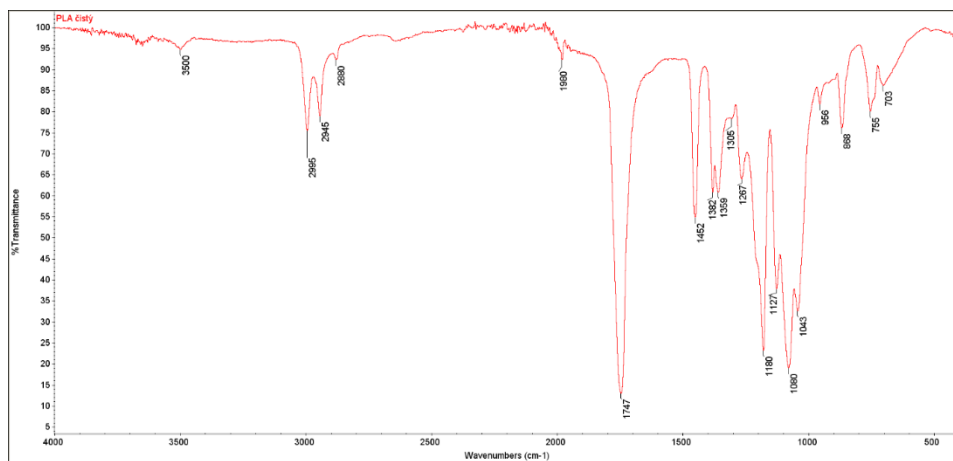


Obrázek 33. FTIR záznam čistého kurkuminu [44].

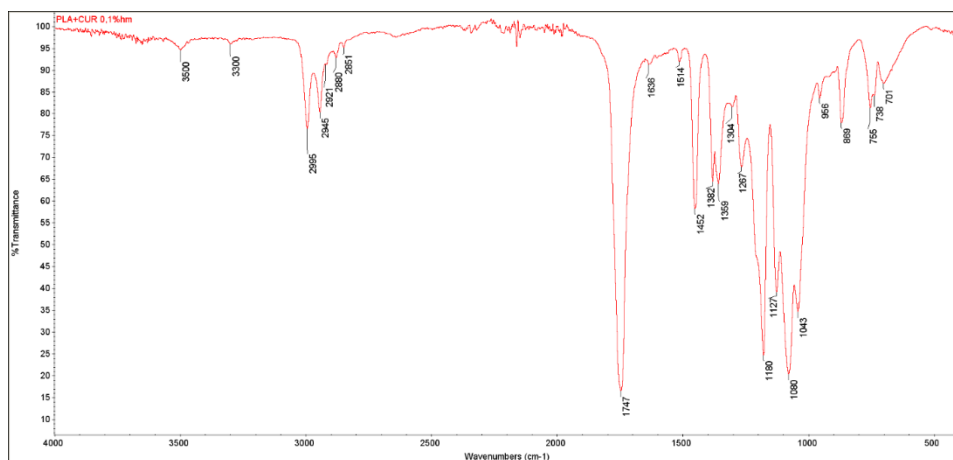


Obrázek 34. FTIR spektrum čistého kurkuminu, naměřeno

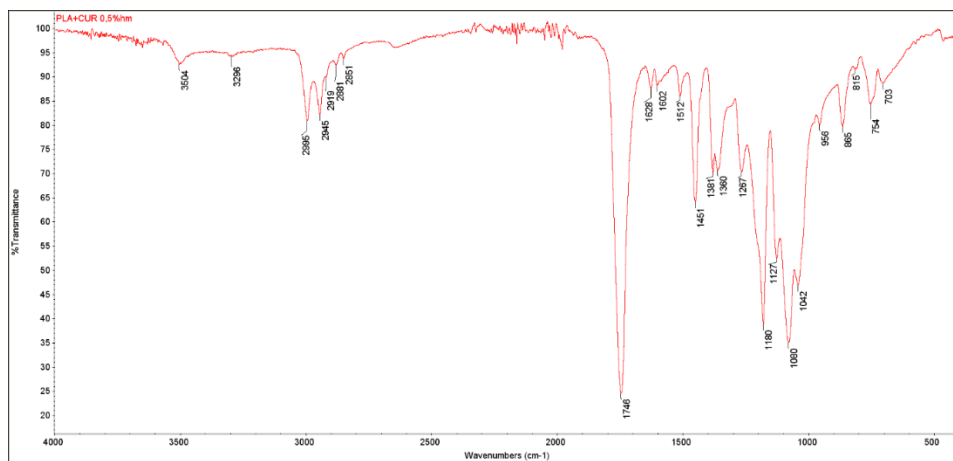
Na obrázcích 35-37 jsou záznamy FTIR pro čistý PLA a následně PLA+CUR ve dvou množstvích. Ze záznamů je patrné, že kurkumin je ve struktuře PLA nezměněn. Vzhledem k poměrovému množství PLA vůči CUR jsou vidět v záznamu pouze typické píky CUR.



Obrázek 35. FTIR spektrum čistý PLA.



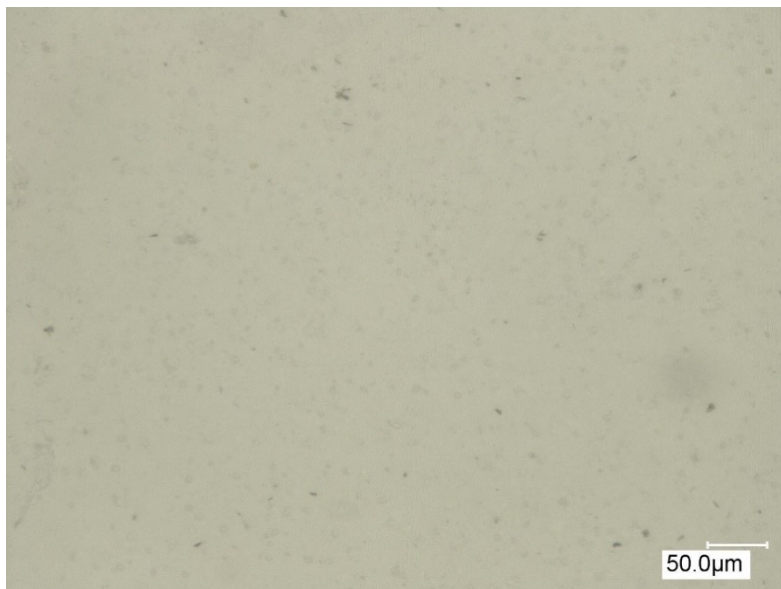
Obrázek 36. FTIR spektrum PLA+CUR 0,1 hm%.



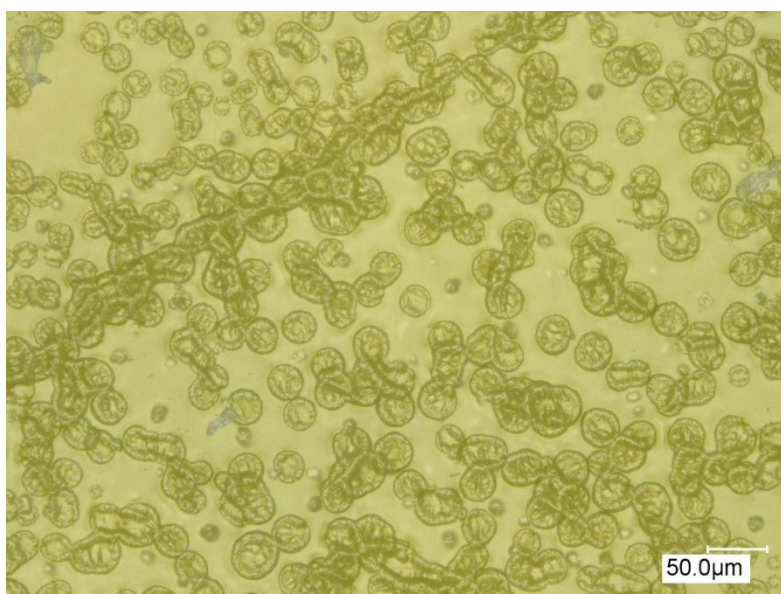
Obrázek 37. FTIR spektrum PLA+CUR 0,5 hm%.

6.1.5 Optická mikroskopie

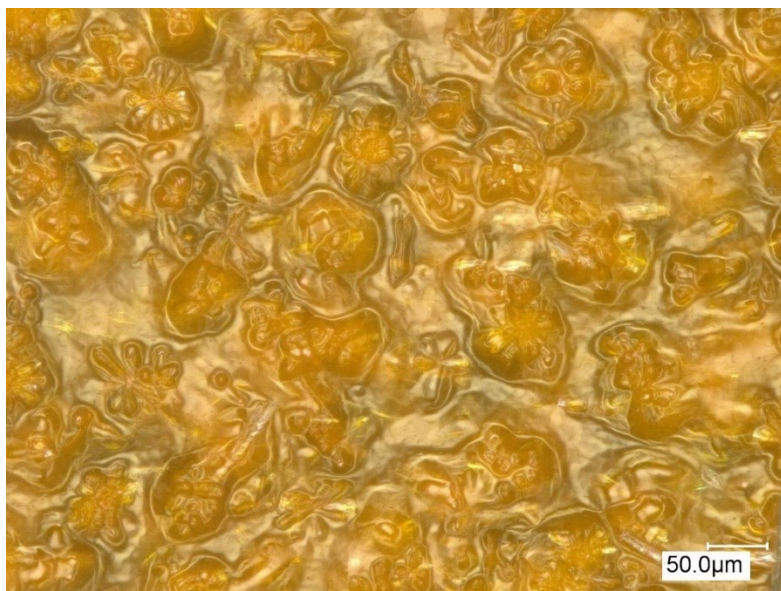
Morfologie vzorku byla rovněž zkoumána pomocí optické mikroskopie. Vzorky byly zkoumány při zvětšení 100, 500 a 1000x. Na obrázku 38 je znázorněn čistý PLA, na obrázcích 39 a 40 je vidět rozprostření kurkuminu v PLA.



Obrázek 38. Optický mikroskop čistý PLA



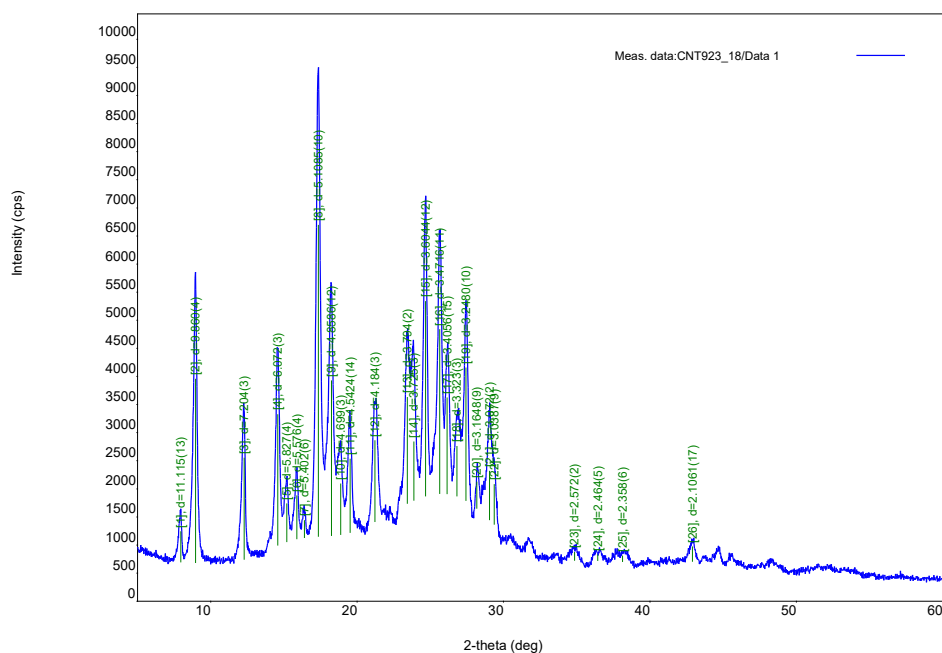
Obrázek 39. Optický mikroskop PLA+CUR 0,1 hm%.



Obrázek 40. Optický mikroskop PLA+CUR 0,5 hm%.

6.1.6 XRD

Charakterizace pomocí rentgenové difrakce (XRD) byla provedena čistého kurkuminu. Záznam difrakčního spektra čistého kurkuminu (obrázek 41).



Obrázek 41. Záznam rentgenového spektra kurkuminu.

Při srovnání s knihovnou rentgenových spekter se skutečně jedná o kurkumin.

6.2 Diskuze výsledků

Připravené vzorky kompozitu PLA+CUR byly podrobeny charakterizaci (UV/VIS, laserová difrakce, antibakteriální testy, SEM, FTIR, XRD a optická mikroskopie). Charakterizace antibakteriálních vlastností prokázala, že pro účinné antibakteriální vlastnosti musí být obsah kurkuminu v látce alespoň 300 mg (Antibakteriální testy 5.5.2, tabulka 10). Na základě charakterizace pomocí skenovací elektronové mikroskopie bylo zjištěno, že kompozit PLA+CUR je stabilní ve vodném prostředí a dochází k pomalé degradaci, při všech pH (SEM 5.5.4, obrázek 29-31). Analýza dále prokázala, že v zásaditém prostředí dochází k rychlému rozpouštění částic kurkuminu na povrchu PLA vrstvy. FTIR (5.5.5, obrázek 34-37) analýza dokázala, že nedochází k reakci mezi PLA a CUR, vyjma samotného mísení mezi sebou. Charakterizace pomocí optické mikroskopie (5.5.6) prokázala, že množství kurkuminu přidaného do PLA ovlivňuje shlukování částic kurkuminu (obrázek 39 a 40). Měření na UV/VIS (5.5.3) spektrometru, ukázalo neměnnost obsahu kurkuminu rozpuštěného v roztoku. U vzorku se zásaditým pH docházelo k rozpouštění částic na povrchu, toto množství odpovídá asi 2 % celkového množství nacházejícímu se ve vzorku.

7. Závěr

Bakalářská práce se zabývá biomedicínským využitím kurkuminu pro léčení ran. V teoretické části jsou popsány vlastnosti kurkuminu, jeho biologická aktivita a ovlivnění léčby ran. Následně je popsán významný průvodce léčby ran, fibrin, rovněž je poté popsán mechanismus léčby ran. V poslední kapitole teoretické části se práce zabývá biokompatibilními polymery, jako možný způsob přenosu kurkuminu do rány. V praktické části je v práci popsána příprava kompozitů na bázi polylaktidu, polyvinylalkoholu a polyvinylpyrrolidonu, s kurkuminem a charakterizace jejich vlastností.

Bylo zjištěno, že:

- Z vybraných polymerů pouze polylaktid umožnil přípravu kompozitu vhodného pro další studium vlastností. PVP+CUR kompozit se nepodařilo připravit. PVA+CUR kompozit nebyl vhodný pro zamýšlenou biomedicínskou aplikaci k léčbě ran kurkuminem.
- Analýza UV/VIS prokázala, že kompozit PLA+CUR se ve vodném roztoku rozkládá pomalu. Při pH 10 dochází pouze k uvolnění částic kurkuminu umístěných na povrchu kompozitu PLA+CUR, a to z důvodu jeho prokázané rozpustnosti v zásaditém prostředí.
- Analýza SEM potvrdila proces rozpouštění částic kurkuminu lokalizovaných na povrchu kompozitu v roztoku o pH 10. Rovněž však prokázala částečnou degradaci PLA ve vodných roztocích o libovolném pH.
- Analýza FTIR neprokázala reakci mezi PLA a CUR, vzniká pouze směs těchto dvou látek.

Uplatnění kompozitu PLA+CUR v biomedicínském inženýrství je limitováno jeho pomalou dobou degradace, tedy velmi pomalým uvolňováním kurkuminu ze vzorku. Pro další výzkum bude vhodné zvolit směs polymerů či kopolymer pro zjednodušení přípravy a dosažení požadovaných vlastností a účinků.

8. Literatura

- [1] PRASAD, Sahdeo, Subash C. GUPTA, Amit K. TYAGI a Bharat B. AGGARWAL. Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. *Biotechnology Advances* [online]. 2014, **32**(6), 1053–1064. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2014.04.004
- [2] BASNET, Purusotam a Natasa SKALKO-BASNET. Curcumin: An anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules* [online]. 2011, **16**(6), 4567–4598. ISSN 14203049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules16064567
- [3] MASSIMINO, Livia C., Henrique A.M. FARIA a Sergio A. YOSHIOKA. Curcumin bioactive nanosizing: Increase of bioavailability. *Industrial Crops and Products* [online]. 2017, **109**(August), 493–497. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2017.09.001
- [4] AKBİK, Dania, Maliheh GHADIRI, Wojciech CHRZANOWSKI a Ramin ROHANIZADEH. Curcumin as a wound healing agent. *Life Sciences* [online]. 2014, **116**(1), 1–7. ISSN 18790631. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2014.08.016
- [5] HATCHER, H., R. PLANALP, J. CHO, F. M. TORTI a S. V. TORTI. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2008, **65**(11), 1631–1652. ISSN 1420682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-008-7452-4
- [6] KUNWAR, A., A. BARIK, B. MISHRA, K. RATHINASAMY, R. PANDEY a K. I. PRIYADARSINI. Quantitative cellular uptake, localization and cytotoxicity of curcumin in normal and tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* [online]. 2008, **1780**(4), 673–679. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2007.11.016
- [7] RAVINDRAN, Jayaraj, Sahdeo PRASAD a Bharat B. AGGARWAL. Curcumin and Cancer Cells: How Many Ways Can Curry Kill Tumor Cells Selectively? *The AAPS Journal* [online]. 2009, **11**(3), 495–510. ISSN 1550-7416. Dostupné z: doi:10.1208/s12248-009-9128-x
- [8] KANAI, Masashi, Kenichi YOSHIMURA, Masanori ASADA, Atsushi IMAIZUMI, Chihiro SUZUKI, Shigemi MATSUMOTO, Takafumi NISHIMURA, Yukiko

- MORI, Toshihiko MASUI, Yoshiya KAWAGUCHI, Kazuhiro YANAGIHARA, Shujiro YAZUMI, Tsutomu CHIBA, Sushovan GUHA a Bharat B. AGGARWAL. A phase I/II study of gemcitabine-based chemotherapy plus curcumin for patients with gemcitabine-resistant pancreatic cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. 2011, **68**(1), 157–164. ISSN 03445704. Dostupné z: doi:10.1007/s00280-010-1470-2
- [9] GUPTA, Subash C., Sridevi PATCHVA a Bharat B. AGGARWAL. Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials. *The AAPS Journal* [online]. 2013, **15**(1), 195–218. ISSN 1550-7416. Dostupné z: doi:10.1208/s12248-012-9432-8
- [10] DHILLON, Navneet, Bharat B. AGGARWAL, Robert A. NEWMAN, Robert A. WOLFF, Ajaikumar B. KUNNUMAKKARA, James L. ABBRUZZESE, Chaan S. NG, Vladimir BADMAEV a Razelle KURZROCK. Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research* [online]. 2008, **14**(14), 4491–4499. ISSN 10780432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0024
- [11] OPPENHEIMER, Albert. Turmeric (Curcumin) in Biliary Diseases. *The Lancet* [online]. 1937, **229**(5924), 619–621. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(00)98193-5
- [12] GUPTA, Subash C., Sridevi PATCHVA, Wonil KOH a Bharat B. AGGARWAL. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* [online]. 2012, **39**(3), 283–299. ISSN 03051870. Dostupné z: doi:10.1111/j.1440-1681.2011.05648.x
- [13] MASEK, Anna, Ewa CHRZESCIJANSKA a Marian ZABORSKI. Characteristics of curcumin using cyclic voltammetry, UV-vis, fluorescence and thermogravimetric analysis. *Electrochimica Acta* [online]. 2013, **107**, 441–447. ISSN 00134686. Dostupné z: doi:10.1016/j.electacta.2013.06.037
- [14] SILVA-BUZANELLO, Rosana Aparecida Da, Ana Caroline FERRO, Evandro BONA, Lúcio CARDOZO-FILHO, Pedro Henrique Hermes De ARAÚJO, Fernanda Vitória LEIMANN a Odinei Hess GONÇALVES. Validation of an Ultraviolet-visible (UV-Vis) technique for the quantitative determination of curcumin in poly(l-lactic acid) nanoparticles. *Food Chemistry* [online]. 2015, **172**,

- 99–104. ISSN 18737072. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2014.09.016
- [15] SHARMA, O. P. Antioxidant activity of curcumin and related compounds. *Biochemical Pharmacology* [online]. 1976, **25**(15), 1811–1812. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/0006-2952(76)90421-4
- [16] DOLAI, Sukanta, Wei SHI, Christopher CORBO, Chong SUN, Saadyah AVERICK, Dinali OBEYSEKERA, Mina FARID, Alejandra ALONSO, Probal BANERJEE a Krishnaswami RAJA. „Clicked" sugar.curcumin conjugate: Modulator of amyloid- β and tau peptide aggregation at ultralow concentrations. *ACS Chemical Neuroscience* [online]. 2011, **2**(12), 694–699. ISSN 19487193. Dostupné z: doi:10.1021/cn200088r
- [17] GASCHLER, Michael M. a Brent R. STOCKWELL. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2017, **482**(3), 419–425. ISSN 10902104. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.086
- [18] SCHRAUFSTATTER, E. a H. BERNT. Antibacterial Action of Curcumin and Related Compounds. *Nature* [online]. 1949, **164**, 456–457. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/164456a0
- [19] ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI, Soheil, Habsah ABDUL KADIR, Pouya HASSANDARVISH, Hassan TAJIK, Sazaly ABUBAKAR a Keivan ZANDI. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *BioMed Research International* [online]. 2014, **2014**. ISSN 23146141. Dostupné z: doi:10.1155/2014/186864
- [20] GUPTA, Ankur, Surabhi MAHAJAN a Rajendra SHARMA. Evaluation of antimicrobial activity of *Curcuma longa* rhizome extract against *Staphylococcus aureus*. *Biotechnology Reports* [online]. 2015, **6**, 51–55. ISSN 2215017X. Dostupné z: doi:10.1016/j.btre.2015.02.001
- [21] OYAGBEMI, Ademola A., Adebowale B. SABA a Azeez O. IBRAHEEM. Curcumin: From food spice to cancer prevention. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2009, **10**(6), 963–968. ISSN 15137368.
- [22] PAN, Min Hsiung, Tsang Miao HUANG a Jen Kun LIN. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metabolism and Disposition*. 1999, **27**(4), 486–494. ISSN 00909556.
- [23] HOLDER, GM, JL PLUMMER a AJ. RYAN. The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione in rat.

Xenobiotica. 1978, **8**(12), 761–768.

- [24] MOHANTY, Chandana a Sanjeeb K. SAHOO. Curcumin and its topical formulations for wound healing applications. *Drug Discovery Today* [online]. 2017, **22**(10), 1582–1592. ISSN 18785832. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2017.07.001
- [25] RAUF, Abdur, Muhammad IMRAN, Ilkay Erdogan ORHAN a Saud BAWAZEER. Health perspectives of a bioactive compound curcumin: A review. *Trends in Food Science and Technology* [online]. 2018, **74**(September 2017), 33–45. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2018.01.016
- [26] MOHAMMADI, Marziyeh Ranjbar, Shahram RABBANI, S. Hajir BAHRAMI, M. T. JOGHATAEI a F. MOAYER. Antibacterial performance and in vivo diabetic wound healing of curcumin loaded gum tragacanth/poly(ϵ -caprolactone) electrospun nanofibers. *Materials Science and Engineering C* [online]. 2016, **69**, 1183–1191. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2016.08.032
- [27] NAIR, Lakshmi S. a Cato T. LAURENCIN. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science (Oxford)* [online]. 2007, **32**(8–9), 762–798. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017
- [28] AHMAD, Ejaj, Munazza Tamkeen FATIMA, Mehboob HOQUE, Mohammad OWAIS a Mohammed SALEEMUDDIN. Fibrin matrices: The versatile therapeutic delivery systems. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2015, **81**, 121–136. ISSN 18790003. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.07.054
- [29] SPICER, Patrick P. a Antonios G. MIKOS. Fibrin glue as a drug delivery system. *Journal of Controlled Release* [online]. 2010, **148**(1), 49–55. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2010.06.025
- [30] RAMOT, Yuval, Moran HAIM-ZADA, Abraham J. DOMB a Abraham NYSKA. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2016, **107**, 153–162. ISSN 18728294. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2016.03.012
- [31] MITTAL, R., J. MORLEY, H. DINOPOULOS, E. G. DRAKOULAKIS, E. VERMANI a P. V. GIANNOUDIS. Use of bio-resorbable implants for stabilisation of distal radius fractures: The United Kingdom patients' perspective. *Injury* [online]. 2005, **36**(2), 333–338. ISSN 00201383. Dostupné z: doi:10.1016/j.injury.2004.09.015

- [32] VERT, M., S. M. LI, G. SPENLEHAUER a P. GUERIN. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 1992, **3**(6), 432–446. ISSN 09574530. Dostupné z: doi:10.1007/BF00701240
- [33] POOLE-WARREN, L. A. a A. J. PATTON. *Introduction to biomedical polymers and biocompatibility* [online]. B.m.: Elsevier Ltd, 2015. ISBN 9781782421139. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-78242-105-4.00001-8
- [34] RAMAKRISHNA, Seeram, Zheng-Ming HUANG, Ganesh V. KUMAR, Andrew W. BATCHELOR a Joerg MAYER. *An Introduction to Biocomposites*. B.m.: Imperial College Press, nedatováno. ISBN 1-86094-425-6.
- [35] KATTI, D. S., S. LAKSHMI, R. LANGER a C. T. LAURENCIN. Toxicity, biodegradation and elimination of polyanhydrides. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2002, **54**(7), 933–961. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/S0169-409X(02)00052-2
- [36] LASPRILLA, Astrid J R, Guillermo A R MARTINEZ, Betânia H. LUNELLI, André L. JARDINI a Rubens Maciel FILHO. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - A review. *Biotechnology Advances* [online]. 2012, **30**(1), 321–328. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2011.06.019
- [37] MADHAVAN NAMPOOTHIRI, K., Nimisha Rajendran NAIR a Rojan Pappy JOHN. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource Technology* [online]. 2010, **101**(22), 8493–8501. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2010.05.092
- [38] DE OLIVEIRA, J., L. P.S. VANDENBERGHE, S. F. ZAWADZKI, C. RODRIGUES, J. C. DE CARVALHO a C. R. SOCCOL. Production and Application of Polylactides. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products* [online]. 2016, 633–653. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-63662-1.00028-2
- [39] NOMURA, Ryoji, Ryoji NOMURA, Toshio MASUDA a Toshio MASUDA. Acetylenic polymers, substituted. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology Vol. 1* [online]. 2001, **4**(1), 1–41. ISSN 0471440264. Dostupné z: doi:10.1002/0471440264
- [40] *Kuaray Specialites Europe KSE GmbH. Mowiol Brochure*. Frankfurt/Main,

German: Kuraray Specialities Europe KSE GmbH, 2003.

- [41] KOUTNÝ, Marek. *Biodegradace polymerů a polymerních materiálů*
Biodegradation of polymers and polymeric materials. 2014. ISBN 9788021450851.
- [42] MLEZICA, J a J. ŠŇUPÁREK. *Polymery - výroba, vlastnosti, zpracování, použití*.
2. přeprac. Praha: Sobotáles, 2000. ISBN 80-85920-72-7.
- [43] KIM, S, PA THIESSEN, EE BOLTON, J CHEN, G FU, A GINDULYTE, L HAN,
J HE, S HE, BA SHOEMAKER, J WANG, B YU, J ZHANG a SH. BRYANT.
PubChem Substance and Compound databases [online]. 2016. Dostupné
z: doi:10.1093/nar/gkv951.
- [44] TSEKOVA, Petya B., Mariya G. SPASOVA, Nevena E. MANOLOVA, Nadya D.
MARKOVA a Iliya B. RASHKOV. Electrospun curcumin-loaded cellulose
acetate/polyvinylpyrrolidone fibrous materials with complex architecture and
antibacterial activity. *Materials Science and Engineering C* [online]. 2017, **73**, 206–
214. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2016.12.086
- [45] GUNES, Hayati, Dumrul GULEN, Reyhan MUTLU, Abdullah GUMUS, Tekin
TAS a Aynur Eren TOPKAYA. Antibacterial effects of curcumin: An in vitro
minimum inhibitory concentration study. *Toxicology and Industrial Health* [online].
2016, **32**(2), 246–250. ISSN 14770393. Dostupné
z: doi:10.1177/0748233713498458

9. Seznam obrázků:

Obrázek 1 – A) kurkuma longa, rostlina a květ, B) oddenek, C) čistá kurkuma, získána vysušením a rozdrčením oddenku

Obrázek 2 – Kurkumin, 1,7-bis(4-hydroxy-3-metoxyfenyl)hepta-1,6-dien-3,5-dion

Obrázek 3 – Demetoxykurkumin

Obrázek 4 – Bis-demetoxykurkumin

Obrázek 5 – Keto- a enolforma

Obrázek 6 – Bis(3,4-dihydroxycinnamoyl)methan

Obrázek 7 – Schéma léčby rány, a) homeostáza a zánětlivá fáze b) proliferační fáze c) epitelizační fáze

Obrázek 8 – Schéma aktivace NF-(κ) B faktoru, čísla 1-3 zobrazují možnost inhibice kurkuminem

Obrázek 9 – Schématické srovnání chronické rány s ránou léčenou kurkuminem

Obrázek 10 – Srovnání kontrolní krysy a krysy léčení PCL/GT/CUR v průběhu 15 dní

Obrázek 11 – Různá uspořádání fibrinu pro terapeutické účely

Obrázek 12 – Schéma vzniku fibrinu

Obrázek 13 – Schéma akutní a chronické fáze reakce na cizí objekt

Obrázek 14 – Struktura polymléčné kyseliny

Obrázek 15 – N-vinylpyrrolidon

Obrázek 16 – A kurkumin ve vodě, B pomletý kurkumin ve 2 hm % roztoku polyvinylpyrrolidonu ve vodě

Obrázek 17 – Distribuce velikostí částic nepomletého kurkuminu

Obrázek 18 – Distribuce velikostí částic pomletého kurkuminu

Obrázek 19 – UV/VIS záznam po týdnu degradace

Obrázek 20 – UV/VIS záznam po dvou týdnech degradace

Obrázek 21 – UV/VIS záznam po třech týdnech degradace

Obrázek 22 – UV/VIS záznam po čtyřech týdnech degradace

Obrázek 23 – UV/VIS záznam po pěti týdnech degradace

Obrázek 24 – UV/VIS záznam kalibračních roztoků CUR/methanol

Obrázek 25 – Kalibrační křivka roztoků CUR/methanol

Obrázek 26 – Degradace PVA+CUR ve vodě

Obrázek 27 – SEM snímek čistého PLA

Obrázek 28 – SEM snímek PLA+CUR

Obrázek 29 – SEM snímek PLA+CUR degradace 3 týdny v pH 10

Obrázek 30 – SEM snímek PLA+CUR degradace 3 týdny v pH 7

Obrázek 31 – SEM snímek PLA+CUR degradace 3 týdny v pH 4

Obrázek 32 – SEM snímek detail částice kurkuminu v PLA kompozitu

Obrázek 33 – FTIR záznam čistého kurkuminu

Obrázek 34 – FTIR spektrum čistého kurkuminu, naměřeno

Obrázek 35 – FTIR spektrum čistý PLA

Obrázek 36 – FTIR spektrum PLA+CUR 0,1 hm%

Obrázek 37 – FTIR spektrum PLA+CUR 0,5 hm%

Obrázek 38 – Optický mikroskop čistý PLA

Obrázek 39 – Optický mikroskop PLA+CUR 0,1 hm%

Obrázek 40 – Optický mikroskop PLA+CUR 0,5 hm%

Obrázek 41 – Záznam rentgenového spektra kurkuminu

10. Seznam tabulek:

Tabulka 1 – Vliv kurkuminu na peroxidaci lipidů in vitro, MDA= 4,4'-diaminodifenylmethan

Tabulka 2 – Vliv bis(3,4-dihydroxycinnamoyl)methanu na peroxidaci lipidů in vitro, MDA= 4,4'-diaminodifenylmethan

Tabulka 3 – Sumární zhodnocení efektu kurkuminu na léčbu ran

Tabulka 4 – Vlastnosti PLA

Tabulka 5 – Vlastnosti PVA

Tabulka 6 – Vlastnosti PVP

Tabulka 7 – Série vzorků PLA+CUR

Tabulka 8 – Série vzorků PVA+CUR

Tabulka 9 – Série vzorků polyvinylpyrrolidonu

Tabulka 10 – Průměrná velikost částic

Tabulka 11 – Výsledky MIC testů s čistým kurkuminem

Tabulka 12 – Změna pH v roztocích se vzorkem